

SÉRIE A, n° 3518

N° D'ORDRE :

4390

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

François POCHON

1^{re} THÈSE. — “ CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS
DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE DE
STAPHYLOCOCCUS PYOGENES ”.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le

1960
=

devant la Commission d'examen.

MM. CHAMPETIER	<i>Président.</i>
LEDERER....	} <i>Examineurs.</i>
ACHER	

PARIS
HERMANN
115, Boulevard Saint-Germain

—
1960
=

SÉRIE A, n° 3518

N° D'ORDRE :

4390

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

François POCHON

1^{re} THÈSE. — “ CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS
DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉASE DE
STAPHYLOCOCCUS PYOGENES ”.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

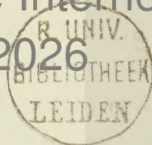
MM. CHAMPETIER	<i>Président.</i>
LEDERER....	} <i>Examineurs.</i>
ACHER.....	

PARIS
HERMANN
115, Boulevard Saint-Germain

—
1960

10/
6

Digitized by the Internet Archive
in 2026



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÉRES

MM.

G. JULIA T Analyse supérieure et algèbre supérieur.
 DE BROGLIE T Théories physiques.
 PRENANT T Anatomie et histologie comparées.
 PÉRES T Mécanique des fluides et applications.
 BARRABE T Géologie structurale et géologie appliquée.
 BOURCART T Géographie, physique et géologie dynamique.
 PLANTEFOL T Botanique.
 GRASSÉ T Evolution des êtres organisés.
 PRÉVOST T Chimie organique.
 BOULIGAND T Application de l'analyse à la géométrie.
 CHAUDRON T Chimie appliquée.
 WYART T Minéralogie.
 TEISSIER T Zoologie.
 MANGENOT T Biologie végétale.
 P. AUGER T Physique quantique et relativité.
 MONNIER T Physiologie générale.
 PIVETEAU T Paléontologie.
 ROCARD T Physique (E.N.S.).
 H. CARTAN T Mathématiques (E.N.S.).
 LAFFITTE T Chimie générale.
 FAVARD T Géométrie supérieure.
 COULOMB T Physique du Globe.
 Mlle COUSIN T Biologie animale (S.P.C.N.).
 CHRÉTIEN T Chimie minérale.
 P. DRACH T Zoologie.
 KASTLER T Physique (E.N.S.).
 EPHRUSSI T Génétique.
 WURMSER T Biologie physico-chimique.
 RIVIÈRE T Géologie (S.P.C.N.), Orsay.
 GAUTHERET T Biologie végétale (P.C.B.)
 LUCAS T Recherches physiques.
 A. THOMAS T Biologie cellulaire.
 ARNULF T Optique appliquée.
 M. MORAND T Enseignement de physique.
 SOLEILLET T Physique (P.C.B.).
 FORTIER T Mécanique expérimentale des fluides.
 DANJON T Astronomie.
 PETIT T Biologie maritime.
 QUENEY T Météorologie et dynamique atmosphérique.
 GALLIEN T Embriologie.
 EICHHORN T Biologie végétale (S.P.C.N.).
 DE CUGNAC T Biologie végétale (S.P.C.N.).
 Mlle CAUCHOIS T Chimie Physique.

THELLIER T Physique du Globe.
 L'HÉRITIER T Génétique.
 GRIVET T Radioélectricité.
 PONCIN T Mécanique générale.
 DUBREIL T Arithmétique et théorie des nombres.
 QUELET T Chimie organique.
 CAGNIARD T Géophysique appliquée.
 CHAMPETIER T Chimie macromoléculaire.
 CUVILLIER T Micropaléontologie.
 JUNG T Pétrographie.
 TRILLAT T Microscopie et diffraction électronique.
 WIEMANN T Chimie organique et structurale.
 JACQUINOT T Spectroscopie et physique céleste.
 VASSY T Physique de l'atmosphère.
 DESTOUCHES T Théories physiques.
 M. PRUVOST T Géologie.
 AMIEL T Chimie générale.
 HOCART T Minéralogie.
 J.-P. MATHIEU T Physique (option), Orsay.
 COUTEAUX T Biologie animale (P.C.B.).
 MAY T Zoologie (Orsay).
 CHOQUET T Théorie des fonctions et topologie.
 FELDMANN T Biologie végétale marine.
 GUINIER T Physique des solides.
 JOST T Physiologie comparée.
 FORTET T Calcul des probabilités et physique mathématique.
 SCHWARTZ T Calcul différentiel et intégral.
 CHOUARD T Physiologie végétale.
 MALAVARD T Aviation.
 BRELOT T Calcul différentiel.
 NORMANT T Synthèse organique.
 BENARD T Chimie minérale.
 BUVAT T Botanique (E.S.N.).
 DUGUE T Statistiques mathématiques.
 GELOSO T Chimie (S.P.C.N.).
 SOULAIRAC T Psychophysiologie.
 ULRICH T Physiologie végétale.
 MARÉCHAL T Optique théorique et appliquée.
 KIRMANN T Théories chimiques.
 CHADEFAUD T Botanique.
 Mlle Le BRETON T Physiologie générale.
 SALEM T Mathématiques générales.
 LELONG T Mathématiques générales.
 DEVILLERS T Anatomie et histologie comparées.
 EHRESMANN T Topologie algébrique.
 FRANÇON T Physique (S.P.C.N.).
 GLANGEAUD T Géographie physique et géologie dynamique.
 GODEMENT T Mathématiques (M.G.P.).
 PISOT T Technique mathématique de la physique.

ROCHE	T Géologie.	PULLMANN	Chimie théorique.
SCHATZMANN.....	T Astrophysique.	TEILLAC	Physique nucléaire et radio-activité.
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique.	TONNELAT.....	Biologie physicochimique.
ZAMANSKI	T Mathématiques générales.	VILLE	T Econométrie.
LENNUIER.....	T Physique (M.G.P.).	WILLEMART	Chimie (P.C.B.).
RIZET	T Génétique.	DODÉ	T Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
ROUTHIER	T Géologie appliquée.	FREYMANN.....	T Physique générale.
Mme TONNELAT....	T Relativité.	GUINOCHE.....	T Biologie végétale (Orsay).
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.).	ROLLET.....	T Chimie (P.C.B.).
SOUCHAY.....	T Chimie générale.	Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.).
AIGRAIN.....	T Electrotechnique générale.	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
BRUSSET	T Chimie minérale.	ARNOULT.....	T Electronique.
M. LÉVY	T Physique théorique des hautes énergies.	CHAPELLE.....	T Physique (M.P.C.) (Orsay).
Mme CHAIX	Chimie biologique.	DELANGÉ	T Mathématiques (Orsay).
Mme HUREL-PY	Biologie végétale (P.C.B.).	DENY	T Mathématiques (M.G.P.).
PIAUX	Chimie (M.P.C.).	GERMAIN.....	T Mécanique théorique des fluides.
BRUN	T Mécanique expérimentale des fluides.	LUCAS G.....	T Géologie.
LEDERER	T Chimie biologique.	ALLARD	T Chimie physique.
Mme DUBREIL.....	T Mathématiques.	BERTHELOT.....	T Physique nucléaire et radioactivité.
Mme LELONG	T Mathématiques (E.N.S.).	BRICARD	Météorologie et physique de l'atmosphère.
BELLAIR.....	T Géologie (S.P.C.N.).	Mme ALBE-FESSARD.	Psycho-physiologie.
COTTE	T Physique (Orsay).	FRIEDEL.....	Physique des solides.
DUBOIS J.-E.....	T Chimie organique.	M. JULIA	Etude des molécules organiques complexes.
LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.).	LENDER	Biologie animale (S.P.C.N.), (Orsay).
MICHEL André	T Chimie (S.P.C.N.).	MAGAT	Physico-chimie des rayonnements
OLMER.....	T Energétique générale.	Mlle QUINTIN.....	T Electrochimie.
ROUAULT.....	T Physique générale.	MONOT.....	T Chimie du métabolisme.
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.	BENOIT.....	T Physiologie animale.
BARCHEWITZ.....	T Chimie physique.	DE POSSEL	T Analyse numérique.
BROSSEL.....	T Physique atomique.	CHARLOT	T Chimie analytique.
BUSER	T Physiologie comparée.	HAISSINSKY.....	T Radiochimie.
CAMUS	T Physiologie végétale (3 ^e cycle).	LEMÉE	T Physiologie (B.M.P.V.).
CASTAING	T Physique générale.	GUÉRIN	T Chimie (M.P.C.).
CURIEN.....	T Minéralogie et cristallographie.		
MOYSE	T Physiologie végétale (Orsay).		
PANNETIER.....	Chimie (S.P.C.N.).		
POSSOMPES	T Zoologie.		

Secrétaire général C. MONIER.

INTRODUCTION

Par analogie avec ce qui a été réalisé pour les protéines, on peut dire que les enzymes hydrolysant les acides nucléiques ou nucléases, présentent un intérêt du point de vue de leur application à l'étude de la structure des acides nucléiques. En effet, il existe maintenant lorsque l'on désire établir l'enchaînement en acides aminés de peptides ou de protéines de faible poids moléculaire, toute une gamme d'enzymes protéolytiques : trypsine, chymotrypsine, etc... Chacun de ces enzymes possède une spécificité bien établie : on connaît l'endroit précis où se fera la coupure enzymatique.

En ce qui concerne les acides nucléiques, MARKHAM et SMITH ont, par exemple, comparé les produits obtenus après action de la soude et de la ribonucléase sur l'acide ribonucléique. Ils ont pu isoler les quatre mononucléotides 3' phosphates, mais encore les quatre mononucléotides 2'-3' phosphates cycliques. Des di- et trinucéotides ont aussi pu être caractérisés dans ces expériences, ainsi que dans celles réalisées par VOLKIN et COHN avec la ribonucléase sur l'ARN du foie de veau. Un des premiers rôles de la ribonucléase a donc été de nous fournir les moyens d'obtenir, par voie enzymatique, toute une série de mono et d'oligonucléotides, tous terminés par des groupements 3' phosphates, d'une façon beaucoup plus aisée que par la synthèse.

En plus de cela, elle permettait à MARKHAM et SMITH de proposer en 1952 une hypothèse sur la structure des ARN. Selon ces auteurs, la structure générale de l'ARN serait une série de chaînes non branchées de nucléotides. Des expériences de SCHMIDT *et al.*, complétant celles-ci, ont montré que l'ARN de levure était formé de chaînes de nucléotides puriques alternant avec des chaînes de nucléotides pyrimidiques. La longueur moyenne de chacune de ces chaînes serait de 2 ou 3 nucléotides.

Les schémas de structure des ARN tels que l'avaient proposés MARKHAM et SMITH et SCHMIDT *et al.* d'autre part, se sont trouvés confirmés indépendamment par les expériences de VOLKIN et COHN. Ces expériences ont trait à la fois à la structure des ARN et au mode d'action de la RNase, deux problèmes qu'il est impossible de dissocier. En examinant les nucléotides libérés après action de la ribonucléase, on se rend compte que sont rompues par la RNase les liaisons Pyp - Pyp et Pyp - Pup.

En ce qui concerne la structure des acides désoxyribonucléiques (ADN), de nombreuses études ont été faites à l'aide de désoxyribonucléases d'origine variée. Plusieurs groupes de travailleurs ont voulu tirer de

l'analyse des hydrolysats d'ADN par les diverses DNases, des enseignements généraux sur la structure des ADN. Le fait que l'on obtienne à partir d'un même substrat, des nucléotides terminés tantôt par des groupements 3' phosphates, tantôt par des groupements 5' phosphates, est une confirmation irréfutable de la liaison 3'-5' phosphodiester. D'autres renseignements ont pu être tirés de ces études. Nous en donnerons un aperçu après avoir exposé nos résultats.

En effet, le présent travail tente d'apporter, par cette même voie enzymatique, des éclaircissements sur la structure des ADN. Pour ce faire nous avons recherché parmi les très nombreuses sources naturelles de DNases, celle présentant un nombre d'avantages maximum : moyen aisé de se procurer ce matériel de départ, quantité d'enzyme importante, stabilité de ce dernier, etc... Notre choix s'est fixé sur la désoxyribonucléase de *Staphylococcus pyogenes*, dont certains auteurs (PRIVAT de GARILHE *et al.*) avaient déjà montré les propriétés toute particulières : production élevée des mononucléotides, activation par les sels de Ca^{++} , etc...

La première partie de ce travail, GÉNÉRALITÉS ET MÉTHODES D'ÉTUDES DANS LE DOMAINE DES ACIDES NUCLÉIQUES, comprend trois chapitres.

Dans le chapitre I, *Nomenclature*, nous avons indiqué la signification des principaux symboles utilisés dans le présent travail.

Le chapitre II, *Généralités sur les enzymes hydrolysant les acides nucléiques et spécialement les désoxyribonucléases*, a pour but de montrer les analogies mais aussi les nombreuses différences qui existent entre les diverses désoxyribonucléases.

Dans le chapitre III, *Matériel et méthodes*, nous avons décrit la préparation des acides désoxyribonucléiques du thymus et du germe de blé que nous avons utilisés au cours de nos recherches. Ce chapitre comporte aussi un paragraphe sur les méthodes d'investigation dans le domaine des acides nucléiques : spectrophotométrie, électrophorèse, chromatographie sur papier et sur échangeurs d'anions. Quelques méthodes des dosages de ces enzymes nucléolytiques sont exposées. Enfin une méthode de culture de *S. pyogenes* en fonction de la production de DNase fait l'objet de quelques pages.

La deuxième partie, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS EN TANT QUE PROTÉINE DE LA DNASE DE *S. pyogenes*, comprend deux chapitres.

Le chapitre I, *Purification de la DNase de Staphylococcus pyogenes*, montre les différents processus expérimentaux que nous avons utilisés au cours de la purification de cet enzyme : précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, dialyse, chromatographie sur échangeurs de cations.

Dans le chapitre II, *Inhibition et activation de la DNase de S. pyogenes par différents agents chimiques*, nous donnons un aperçu de quelques-unes des propriétés en tant que protéine, de cette DNase : action des sels métalliques, des réducteurs, des agents de chélation, etc...

La troisième partie, DÉSOXYRIBONUCLÉOTIDES PRODUITS PAR ACTION DE LA DNASE DE *S. pyogenes* SUR DIFFÉRENTS ADN, montre comment les divers oligonucléotides produits par cette DNase ont été identifiés et dosés. Nous verrons dans cette partie, qui représente à elle seule une part

importante de ce travail, comment nous avons pu définir la structure des mononucléotides, dinucléotides, trinucéotides, grâce à l'action sur ces composés de phosphomonoestérases et phosphodiesterases. La structure de ces nucléotides quant à leurs dimensions et quant à la séquence des bases qui s'y trouvent présente de grandes différences avec celles des nucléotides produits par les autres DNases connues actuellement.

Cette étude permet d'apporter quelques éclaircissements quant à la structure des acides nucléiques et montre aussi la complexité du problème.

GÉNÉRALITÉS ET MÉTHODES D'ÉTUDES DANS LE DOMAINE DES ACIDES NUCLÉIQUES

CHAPITRE I

NOMENCLATURE

Les noms des nucléotides sont extrêmement longs à écrire ; citons par exemple celui d'un dinucléotide : 5'-phosphodésoxyguanosine-3'-désoxyadénosine-5'-phosphate. Il est évident que l'on a intérêt à utiliser une nomenclature abrégée. Il y a quelques années, un système a été proposé par SMITH et MARKHAM (1952) et depuis employé par de nombreux auteurs. L'année dernière, ce système a en quelque sorte reçu une confirmation officielle, puisqu'il est exigé pour les auteurs de *Journal of Biological Chemistry*. Nous l'utiliserons par la suite, aussi allons-nous l'exposer en détail.

Une lettre capitale représente un nucléoside.

A = adénosine

C = cytidine

G = guanosine

T = thymidine

Pu = nucléoside purique

Py = nucléoside pyrimidique

X, Y, Z = nucléoside non spécifié

La lettre (*d*) entre parenthèse précédant le nom d'un nucléotide montre que celui-ci est un dérivé de l'acide désoxyribonucléique et renferme dans sa molécule du désoxyribose.

Les symboles suivants signifient :

ADN = acide désoxyribonucléique

ARN = acide ribonucléique

DNase = désoxyribonucléase

RNase = ribonucléase

La lettre *p* représente un groupement phosphoryle :

— si elle précède la lettre capitale, cela signifie que le groupement phosphoryle est lié au carbone 5' du pentose,

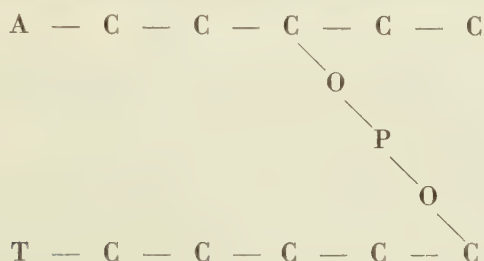
— si elle suit la lettre capitale, le groupement phosphoryle est lié au carbone 3' du pentose,

— si elle se trouve placée entre deux lettres capitales, le groupement phosphoryle lie le carbone 3' du premier nucléoside au carbone 5' du second nucléoside.

Exemples : (d) pA = désoxyadénosine 5' monophosphate.

(d) Ap = désoxyadénosine 3' monophosphate.

En écriture abrégée, comme nous l'utiliserons souvent, on peut représenter une liaison phosphodiester par le schéma suivant :



En ce qui concerne les acides nucléiques proprement dits, c'est-à-dire les hauts polymères tels qu'on peut les isoler à partir des tissus animaux ou végétaux, différents noms ont été proposés au cours de ces dernières années. A l'heure actuelle, la plupart des auteurs utilise les deux appellations : acide désoxyribonucléique et acide ribonucléique que l'on écrit en écriture abrégée ADN et ARN. Les auteurs de langue française préfèrent le préfixe désoxy- au préfixe déoxy- employé par les anglo-saxons. Nous nous en tiendrons à la tradition des premiers.

Comme toutes les nomenclatures, celle que nous venons d'exposer a ses défauts :

— il n'y a pas de symboles pour désigner les bases puriques et pyrimidiques,

— les appellations désoxyribonucléiques et ribonucléiques laissent supposer que les seuls sucres que l'on puisse rencontrer dans les acides nucléiques sont le désoxyribose et le ribose. Ceci n'est pas exempt de toute critique (DAVIDSON, 1949-1953).

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES HYDROLYSANT LES ACIDES NUCLÉIQUES ET SPÉCIALEMENT LES DÉSOXYRIBONUCLÉASES

Les enzymes hydrolysant les acides nucléiques que LASKOWSKI (1951, 1959) a proposé d'appeler enzymes nucléolytiques, ont été classés par cet auteur en quatre catégories.

Si l'on considère une macromolécule d'acide nucléique, le premier stade de dégradation est l'hydrolyse des liaisons phosphodiester entre les différents nucléotides : les enzymes responsables de ce catabolisme sont les nucléases. Viennent ensuite les nucléophosphatases qui détachent les groupements phosphates des mononucléotides obtenus précédemment. Le troisième groupe d'enzyme comprend les nucléosidases qui libèrent des bases puriques ou pyrimidiques libres en hydrolysant les liaisons bases-pentoses. Enfin, les nucléodésaminases provoquent l'apparition d'ammoniaque libre à partir de ces mêmes bases.

NUCLÉASES.

Comme base de classification de ces enzymes, on peut faire appel à la spécificité de ces derniers que l'on peut définir à l'aide de quatre critères :

1. Le substrat susceptible d'être hydrolysé : il peut s'agir d'acide ribonucléique, d'acide désoxyribonucléique ;

2. Le type d'attaque : suivant que celle-ci a lieu à l'intérieur des chaînes de nucléotides ou se fait en commençant par une extrémité de celle-ci, de façon récurrente, il s'agit de nucléases qualifiées d'endonucléases ou d'exonucléases ;

3. Les produits obtenus : les oligonucléotides libérés sous l'action de ces enzymes peuvent être terminés soit par des groupements 3' phosphates, soit par des groupements 5' phosphates ;

4. Les liaisons préférentiellement rompues : le site de rupture dans la chaîne de nucléotides est en rapport avec la nature purique ou pyrimidique des bases adjacentes aux liaisons phosphodiester. Dans ce groupe des nucléases, on peut donc distinguer :

— les désoxyrobonucléases s'attaquant aux acides désoxyribonucléiques avec production d'oligonucléotides de poids moléculaire plus ou moins élevé ;

— les ribonucléases qui hydrolysent les acides ribonucléiques en libérant aussi des oligonucléotides de dimensions variées ;

— les phosphodiesterases qui catalysent en général la scission des liaisons phosphodiester et en particulier celles se trouvant dans les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques, avec libération non plus de polynucléotides, mais de mononucléotides.

NUCLÉOPHOSPHATASES.

On peut aussi classer ces enzymes en faisant appel à la spécificité plus ou moins stricte de ces derniers. Nous ne dirons ici que quelques mots de la 5' nucléotidase du venin de *Crotalus Adamanteus*.

A) DÉSOXYRIBONUCLÉASES

Comme le montre le tableau I situé à la fin de ce chapitre, les désoxyribonucléases sont très nombreuses. Il en existe dans tous les tissus. Quelques-unes d'entre elles ont été étudiées en détail. Ce sont toutes des endonucléases, c'est-à-dire qu'elles catalysent la coupure des liaisons internucléotidiques à l'intérieur des chaînes de polynucléotides.

1) DÉSOXYRIBONUCLÉASE PANCRÉATIQUE OU DNase I.

Cet enzyme fut cristallisé par KUNITZ (1950) par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium d'extraits de pancréas de bœuf. Cet auteur avait tout de suite remarqué que son action se traduisait par une liquéfaction des gels d'ADN, sans libération de phosphate inorganique et ceci à pH 7,0, pH optimum d'activité, en présence d'ions Mg^{++} .

De nombreux auteurs (SINSHEIMER, 1954, 1954 ; PRIVAT DE GARILHE *et al.*, 1955) ont ensuite étudié les fragments nucléotidiques produits. Pour ce faire, un hydrolysate de 200 mg environ d'ADN du thymus ou du germe de blé est chromatographié sur une colonne de Dowex I-X₂. Une seconde chromatographie sur Dowex I-X₈ permet d'isoler à l'état pur tous les nucléotides et d'élucider ainsi leur structure.

Voici les résultats obtenus :

Le DNase I produit moins de 1 % de mononucléotides. L'action de la 5' nucléotidase sur ceux-ci provoque une libération de phosphate, ce qui montre que le groupement phosphoryle est fixé sur le carbone 5' du désoxyribose. Les dinucléotides et trinucléotides, dont nous donnons à titre d'exemple quelques-uns d'entre eux, représentent 15 % à 18 % de la densité optique totale à 260 m μ . Le reste de l'hydrolysate est totalement élué avec du tampon acétate d'ammonium 2 M. D'après KUNITZ, la dimension moyenne des fragments serait celle de tétranucléotide. Une liaison sur quatre serait donc rompue.

Comme le montre le tableau ci-inclus, on remarque que la liaison Pyp - Pup est absente. On en conclut qu'elle est préférentiellement rompue, ce qui permet de définir la spécificité de cette DNase.

*Dinucléotides produits par action de la DNase II
sur l'ADN du thymus*

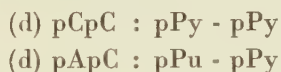
(d) Cp Cp	: (d) Pyp — Pyp
(d) Cp Tp	: (d) Pyp — Pyp
(d) Ap Tp	: (d) Pup — Pyp
(d) Ap Ap	: (d) Pup — Pup
(d) Gp Ap	: (d) Pup — Pup
(d) Gp Ap Cp	: (d) Pup — Pup — Pyp

Les dinucléotides et trinucléotides représentent respectivement 3,3 % et 5,5 % de la densité optique totale à 260 mμ. Du tampon 3 M est nécessaire pour éluer tout le matériel absorbant, ce qui montre que l'on a des oligonucléotides de poids moléculaire beaucoup plus élevé que dans le cas de la DNase I. Le nombre de liaisons rompues est plus faible.

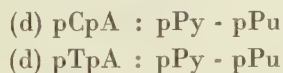
3) DÉSOXYRIBONUCLÉASE DE STREPTOCOQUE OU STREPTODORNASE

On trouve dans le commerce une préparation partiellement purifiée de streptodornase. Cette préparation est extraite de cultures de streptocoques et a servi de point de départ aux expériences de POTTER *et al.* (1959).

Comme pour les DNases I et II, un hydrolysats (à pH 7,0 en présence d'ions magnésium) d'ADN du thymus, est chromatographié sur colonne de Dowex I. Il n'y a pas de mononucléotide. Deux dinucléotides ont pu être isolés.



La fraction 2 M une fois lyophilisée est soumise à l'action de la DNase I puis chromatographiée sur Dowex I-X 2. On isole deux dinucléotides.



Des travaux précédents avaient montré que la liaison préférentiellement rompue par la DNase I était pPu - pPy. Dans le cas de la streptodornase ce serait l'inverse : pPy - pPu. On peut donc dire que, comme pour la DNase II, la liaison préférentiellement rompue est celle existant entre une base pyrimidique et purique, mais, avec le premier enzyme, les nucléotides sont terminés par un groupement phosphoryle fixé sur le carbone 3' du pentose, avec la streptodornase les nucléotides ont leur groupement phosphoryle fixé sur le carbone 5' du désoxyribose.

B) PHOSPHODIESTÉRASE

Nous ne dirons que quelques mots de la phosphodiesterase du venin de *Crotalus adamanteus*, cet enzyme n'ayant qu'un rapport indirect avec le présent travail.

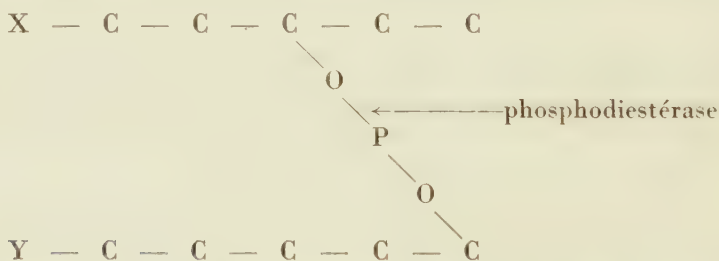
Le venin de certains serpents (Crotalidés) contient un grand nombre d'enzymes : DNase, RNase, phospholipase, adénosine triphosphatase, etc., mais, et ceci en quantité beaucoup plus grande, de la phosphodiesterase.

Par deux chromatographies successives sur Amberlite IRC 50-XE 64, une troisième sur carboxyméthyl cellulose (PRIVAT DE GARILHE *et al.*, 1955), il est possible d'obtenir de la phosphodiesterase chromatographiquement pure, exempte des autres activités citées ci-dessus. La phosphodiesterase coupe toutes les liaisons phosphodiesters, et en particulier celles des ADN et des ARN :

RAZZEL et KHORANA (1958) et HEPPEL et RABINOWITZ (1958) ont montré que l'action de cet enzyme est récurrente ou « stepwise degradation », c'est-à-dire qu'il y a rupture d'une liaison internucléotidique, puis d'une autre, ceci à partir d'une extrémité de la chaîne polynucléotidique.

Soit par exemple le polymère : TpTpTpTpT.

Il y a libération d'acide thymidylique 5' à partir de l'extrémité qui porte un groupement 3' hydroxyle. Le dernier produit à apparaître est donc la thymidine. La coupure entre deux nucléotides se fait entre le carbone 3' du pentose et le phosphore.

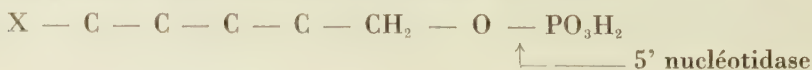


Cet enzyme rend de grands services, comme il sera montré par la suite, quand il faut établir la structure de dinucléotides ou trinucléotides par exemple, isolés à partir d'hydrolysats d'acides nucléiques par une DNase ou RNase.

C) PHOSPHATASES

Nous ne parlerons ici que de la 5' nucléotidase.

Cette phosphatase spécifique (elle ne libère que le groupement phosphate fixé sur le carbone 5' du pentose) se trouve en quantité non négligeable dans les venins de certains Crotalidés.



Si l'on fait agir cet enzyme sur un nucléoside phosphate, il est possible suivant le résultat obtenu, de dire si le groupement phosphate terminal est lié au carbone 3' ou au carbone 5' du pentose. En effet, dans le premier cas, il n'y aura pas de libération du phosphate minéral, l'inverse se produira dans le second cas.

On voit que cet enzyme sera d'une grande utilité car il permettra de voir si des mononucléotides produits par action d'une nucléase sur un acide nucléique sont des nucléosides 3' ou 5' monophosphates.

TABLEAU I. — *Désoxyribonucléases.*

Origine et noms	pH optimum	Activateur	Auteurs	Spécificité
Pancréas de bœuf DNase I	7,0	Mg ⁺⁺	KUNITZ 1950 SINSHEIMER 1954 PRIVAT DE GARILHE et LASKOWSKI 1955 POTTER, LAURILA et LASKOWSKI 1958	Endonucléase : — liaison préféren- tiellement rompue : (d) pPu – pPy, — nucléotides termi- nés par des groupe- ments 5'-phosphates.
Thymus de veau DNase II	4,6	Cations divalents	MAVER et GRECO 1949 WEBB 1952, 1953 <i>a et b</i> LASKOWSKI <i>et al.</i> 1954 PRIVAT DE GARILHE et LASKOWSKI 1955 <i>b</i> LAURILA et LAS- KOWSKI 1957 FREDERIC <i>et al.</i> 1958	Endonucléase : — liaison préféren- tiellement rompue : (d) Pyp – Pup, — nucléotides termi- nés par des groupe- ments 3'-phosphates.
Rate de veau DNase II	4,5 7,0	—	MCDONALD 1955 SHIMOMURA et LAS- KOWSKI 1957	
Rein de veau DNase I	7,0	Mg ⁺⁺	CUNNINGHAM et LASKOWSKI 1953	
Rein de veau DNase II	4,5	—	CUNNINGHAM et LASKOWSKI 1953	
Sérum humain	7,5	Mg ⁺⁺	WROBLEWSKI et BODANSKY 1949	
Streptocoque	7,5	Mg ⁺⁺	McCARTY 1949	
<i>E. coli</i>			LEHMAN <i>et al.</i> 1958	
Streptocoque Streptodornase	7,0	Mg ⁺⁺	POTTER et LASKOWSKI 1959	Endonucléase : — liaison préféren- tiellement rompue : pPy – pPu, — nucléotides termi- nés par des groupe- ments 5'-phosphates.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) PRÉPARATION DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES

Il existe plusieurs méthodes de préparation des acides désoxyribonucléiques. Nous ne décrivons ici que celles qui sont le plus couramment utilisées. On peut distinguer trois étapes principales :

— L'extraction à l'aide d'une solution saline peu concentrée de toutes les impuretés d'origine protéique entre autres.

— On fait ensuite passer l'ADN en solution en s'aidant d'agents tensioactifs. Les impuretés qui ne sont pas dissoutes sont éliminées par centrifugation.

— L'ADN est précipité de sa solution aqueuse par addition d'un volume égal d'alcool éthylique.

I) PRÉPARATION DU DÉSOXYRIBONUCLÉATE DE SODIUM DU THYMUS DE VEAU (KAY *et al.*, 1952).

1. Il est indispensable que le thymus soit immédiatement prélevé après la mort de l'animal et congelé. Dans le cas contraire on risquerait d'obtenir un ADN partiellement dépolymérisé par les DNases des tissus. Ce thymus, une fois congelé, peut être conservé sous cette forme pendant quelques semaines. Nous n'avons pas observé de phénomène de dégradation (mesures viscosimétriques) sur les ADN extraits de thymus gardés à — 20 degrés pendant deux mois.

2. Cinquante g de tissu sont broyés dans un appareil du type « Turmix » pendant 3 minutes, dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 % contenant du citrate de soude à la concentration de 0,01 M. Il faut que cette solution soit au préalable refroidie. On centrifuge (2 500 t/mn) à basse température pendant 30 minutes. On rejette le liquide surnageant contenant les impuretés et on traite le culot de centrifugation, essentiellement composé de « fibres de chromatine », comme précédemment. Ce processus est répété trois fois.

3. Le culot de centrifugation est alors traité au « Turmix » avec 1 litre de NaCl 0,9 % à 0° et l'homogénat obtenu versé dans un grand bécher ou ballon à fond plat. On ajoute doucement, tout en réalisant une agitation mécanique vigoureuse, 90 ml d'une solution de Duponol à 5 % dans l'alcool éthylique à 45 %. Le mélange se transforme peu à peu en une solution visqueuse. On continue l'agitation pendant 3 heures à température ordinaire.

4. On amène alors la concentration en NaCl à 1 M (55 g). L'agitation est encore maintenue pendant 10 minutes. On centrifuge à 2 500 t/mn pendant 3 heures.

5. Le liquide surnageant est décanté du culot protéique. On précipite alors le désoxyribonucléate de sodium par addition d'un volume égal d'alcool éthylique à 95 %. Ce précipité, d'abord gélatineux, se transforme en une masse blanche fibreuse qui se déshydrate peu à peu : on peut l'enrouler autour d'une baguette de verre.

6. On lave trois fois ce précipité à l'alcool éthylique à 95 %, puis à l'acétone, un nombre suffisant de fois pour que celle-ci reste claire. On sèche à l'air. On obtient environ 2 g de substance.

7. Le désoxyribonucléate de sodium est alors dissous dans 700 ml d'eau distillée : cette opération nécessite environ 2 heures d'agitation vigoureuse. On ajoute 63 ml de solution de Duponol. On agite encore une heure, puis on amène la concentration en NaCl à 1 M (45 g). La solution est alors centrifugée à 13 000 t/mn pendant une heure. On précipite alors le DNate de sodium en ajoutant un volume égal d'éthanol à 95 %. On lave à l'alcool et à l'acétone.

8. Le produit ainsi obtenu est redissous dans 700 ml d'eau distillée ; 6,3 g de NaCl sont ajoutés de telle façon que sa concentration finale soit de 0,9 % : ceci provoque la précipitation des moindres traces de protéines. On centrifuge à 13 000 t/mn.

9. On amène la concentration en NaCl de la solution à 1 M et on précipite le DNate de sodium en ajoutant doucement et avec agitation un volume égal d'éthanol. On lave à l'alcool éthylique et à l'acétone jusqu'à ce que celle-ci reste limpide.

Remarques.

— Le Duponol peut être remplacé par un autre détergent : le dodecyl-sulfate.

— Au stade 2 la présence de citrate de sodium est discutable. En effet ce sel avait pour but d'inhiber la DNase présente dans le thymus par analogie avec la DNase pancréatique qui voit son action presque totalement inhibée en présence de citrate : ce composé complexe, en effet, les cations divalents indispensables à l'action de cette DNase. On sait maintenant que la DNase du thymus, par exemple, n'est pas inhibée par le citrate, mais au contraire par les ions Mg^{++} , qui eux, activent la DNase pancréatique.

— Quand on désire préparer de grandes quantités de désoxyribonucléate de sodium, on a intérêt à faire passer en solution la nucléohistone

(NaCl 10 %) puis à précipiter celle-ci à l'alcool éthylique (stade 3, avant addition du Duponol).

II) PRÉPARATION DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE DU GERME DE BLÉ (MODIFICATION DE LA MÉTHODE DE LIPSHITZ *et al.*, 1956).

Il est possible de se procurer des germes de blé, aux Grands Moulins de Pantin, par exemple. Il est indispensable d'aller chercher ces germes sur place, afin de les plonger immédiatement après séparation de la graine dans de l'alcool absolu. Cette précaution a pour but d'éviter la dégradation, qui est très rapide, de tous les constituants des germes. Toutes les opérations sont faites à la chambre froide.

1. On traite 300 g de germes de blé dans un appareil du type « Turmix » pendant 8 minutes avec 750 ml d'éthanol. Après addition de 750 ml d'éther, l'homogénat est soumis à une agitation douce pendant 90 minutes. Ce traitement a pour but de dissoudre tous les composés lipidiques qui, dans le germe de blé, sont en grande quantité.

2. Après filtration et séchage à l'air afin d'éliminer les dernières traces d'alcool et d'éther, le résidu est mis en suspension dans 750 ml d'une solution de NaCl à 0,9 % contenant du citrate de sodium à la concentration de 0,05 M. On réalise une forte agitation pendant une heure et on centrifuge à $3\,600 \times g$ pendant 15 minutes. Le culot (mélange de son, d'amidon... et d'une petite quantité d'acide nucléique) est soumis neuf fois de suite au processus indiqué ci-dessus. La solution de NaCl doit être, après ces lavages répétés, limpide.

3. Le germe de blé est alors traité dans un « Turmix » pendant 2 minutes avec une solution de NaCl à 10 %. La suspension que l'on obtient est très visqueuse du fait du passage en solution des nucléoprotéines. On centrifuge 15 minutes à $3\,600 \times g$ afin d'éliminer la plus grande partie du matériel insoluble puis ensuite pendant une heure dans une centrifugeuse « Spinco » à $20\,000\ t/mn$.

5. Cette solution est ensuite versée doucement dans 2 volumes d'alcool éthylique à 95 %. Si l'alcool est ajouté à la solution de nucléoprotéine, on n'observe aucune précipitation. On peut enrouler une partie du précipité qui se trouve sous forme de fibres autour d'un agitateur. L'autre partie du précipité est granuleuse, on la recueille par filtration. On lave à l'alcool à 80 % puis à 95 %.

5. La nucléoprotéine est dissoute dans 500 ml d'eau distillée et traitée par la méthode de KAY *et al.* (KAY *et al.*, 1952).

6. Le désoxyribonucléate de sodium ainsi obtenu et redissous dans un minimum d'eau, contient près de 20 % d'acide ribonucléique (réaction au phloroglucinol, EULER *et al.*, 1946). Afin d'éliminer l'ARN, cette solution est traitée pendant 30 minutes à 37° , pH 7,0, par la RNase. Après dialyse contre de l'eau distillée, on précipite l'ADN par addition d'un volume égal d'alcool à 95 % (il ne faut pas oublier d'amener la concentration en NaCl à 1 M avant d'ajouter l'alcool). On élimine par ce traitement 97 % de l'ARN.

On obtient ainsi environ 800 mg d'ADN à partir de 1 000 g de germes de blé.

B) QUELQUES MÉTHODES D'INVESTIGATION DANS LE DOMAINE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Nous ne nous proposons pas dans ce paragraphe d'exposer toutes les méthodes modernes d'investigation dans le domaine des acides nucléiques. Nous indiquerons seulement les procédés les plus couramment utilisés, surtout ceux qui se rapportent à l'identification des divers composés nucléotidiques obtenus après action d'une nucléase sur un acide nucléique.

1) SPECTROPHOTOMÉTRIE.

Chacune des bases puriques et pyrimidiques possède entre 200 m μ et 300 m μ un spectre caractéristique. Le spectre des nucléosides et des nucléosides phosphates ne présente pas, par rapport à la base qu'ils contiennent, une variation très sensible (BEAVEN *et al.*, 1955). Par contre, l'ionisation possède une grande influence sur les variations du spectre dans le cas de l'acide cytidylique, par exemple : si l'on veut identifier un nucléotide par son spectre, il faut donc toujours se placer au même pH (voir tableau II).

Nous voudrions seulement indiquer une application pratique de ces propriétés. Si l'on examine le spectre de ces mononucléotides, on remarque que la valeur de la densité optique à 260 m μ divisée par la valeur de la densité optique à 280 m μ est caractéristique de chacun de ces composés.

$$\begin{aligned} (*) \quad (d) \text{ pC} &= 0,63 \\ &\text{pT} = 1,38 \\ (d) \text{ pA} &= 6,18 \\ (d) \text{ pG} &= 1,50 \\ (d) \text{ pM} &= 0,42 \end{aligned}$$

C'est un procédé extrêmement simple pour identifier un « pic » nucléotidique au sortir d'une colonne de Dowex I par exemple, si l'on trouve expérimentalement l'une des valeurs inscrites ci-dessus. Mais cela n'indique pas s'il s'agit d'un nucléoside, d'un nucléoside phosphate ou d'un dinucléotide possédant deux bases identiques. Il faudra soumettre ces corps à d'autres tests : chromatographie sur papier, électrophorèse, chromatographie sur colonne, dosage de phosphore, etc., dont nous parlerons plus loin.

Maintenant, considérons un dinucléotide contenant deux bases différentes : (d) pC pT par exemple ; de tels composés auront un spectre caractéristique qui est la moyenne entre le spectre des deux bases qui les constituent.

Le rapport d.o. 260/d.o. 280 pourra être calculé d'après la relation suivante :

$$\text{d.o.} \frac{260}{280} = \frac{\text{d.o. 260 de (d) pC} + \text{d.o. 260 de pT}}{\text{d.o. 280 de (d) pC} + \text{d.o. 280 de pT}} = 1,01 \quad (\text{pH} = 4,5).$$

(*) Ces valeurs sont empruntées à SINSHEIMER (1954). Le pH de ces solutions de nucléotides est de 4,3.

TABLEAU II. — *Spectre d'absorption en ultraviolet des désoxyribonucléotides d'après Sinsheimer (SINSHEIMER, 1954)*

Longueur d'onde (mμ)	Acide 5-méthylcytidylique		Acide cytidylique		Acide thymidylique	Acide adénylique		Acide guanylique
	pH 4,3	pH 5,5-7,0	pH 4,3	pH 5,5-7,3	pH 4,3-7,0	pH 4,3	pH 5,5-7,0	pH 4,3-7,0
240	3,47	6,84	4,14	7,38	3,06	5,98	6,61	10,1
250	2,49	5,24	4,48	6,54	6,00	12,1	12,5	14,5
253	3,08	5,00	5,06	6,68	7,07	13,7	14,1	14,9
260	4,25	5,45	7,30	8,10	9,13	15,3	15,7	12,8
270	7,37	7,74	11,0	10,1	10,0	10,5	10,4	10,4
280	10,1	8,55	11,5	7,95	6,60	2,48	2,21	8,55
290	9,49	5,64	6,90	2,42	1,99	0,18	0,11	3,43
300	5,27	1,39	1,59	0,20	1,16	0	0	0,36

Si donc au cours d'une chromatographie sur colonne on trouve « un pic » nucléotidique ayant un rapport constant, on pourra admettre en première approximation que ce « pic » ne renferme qu'une seule substance. Un rapport non constant est la preuve certaine d'un mélange de composés.

2) ELECTROPHORÈSE.

La méthode la plus utilisée est celle décrite par MARKHAM et SMITH (MARKHAM et SMITH, 1952 ; SMITH, 1955).

Nous avons monté un appareil qui se compose de trois cuves juxtaposées A, B, C, les cuves A et C contenant du tampon, la cuve B du tétrachlorure de carbone destiné à éviter tout échauffement. Les électrodes sont en platine (fig. 1). On se sert d'un appareil donnant du courant continu (de 0 à 2 000 volts). On utilise comme papier du Whatman n° 1 ou du Whatman n° 3. Ce dernier a l'avantage d'être beaucoup moins fragile.

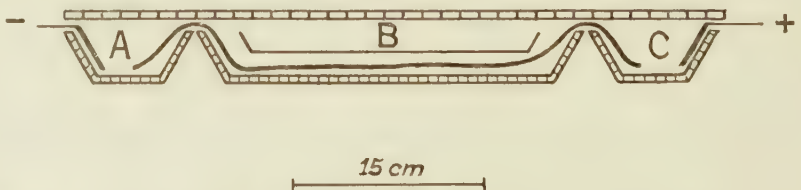


FIGURE 1. — Appareil d'électrophorèse. Cet appareil se compose de trois cuvettes A, B, C (B = 40 cm × 20 cm × 6 cm). Les électrodes sont soigneusement isolées en raison de la haute tension. Une plaque de verre recouvre l'ensemble par mesure de sécurité et afin d'éviter l'évaporation du tétrachlorure de carbone (cuvette B). Les cuvettes A et C contiennent du tampon.

On commence par imbiber cette bande avec du tampon (acétate ou formiate d'ammonium, par exemple) au pH et à la molarité voulus et on l'éponge très soigneusement entre deux feuilles de papier filtre. Le mélange que l'on désire analyser est placé sur cette bande (en une seule fois : il faut donc un très petit volume de liquide) et celle-ci est plongée en son milieu dans le bac contenant du tétrachlorure de carbone, ses deux extrémités se trouvant dans les cuves contenant le tampon. En fin d'électrophorèse, on éponge la bande de papier entre deux feuilles de papier filtre. Les taches sont localisées au moyen d'une lampe à ultraviolets de faibles longueurs d'onde (mineralight modèle SL 2537) : elles apparaissent en noir. On peut éluer ces taches afin d'en faire le spectre, doser le phosphore, etc., mais en prenant soin aussi d'éluer une bande de papier qui servira de « blanc ».

Les conditions expérimentales que nous avons utilisées pour la séparation des nucléotides sont :

- tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 3,5 ;
- tension : 1 500 volts ;
- durée : de 1 h à 2 h.

L'électrophorèse est une méthode très rapide et précise pour juger de la pureté d'une substance nucléotidique, pour séparer les nucléosides ayant un, deux ou trois groupements phosphates.

3) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

La chromatographie sur papier a été appliquée pour la première fois aux dérivés des acides nucléiques par VISHNER ET CHARGAFF (VISHNER et CHARGRAFF, 1947). Depuis cette époque de nombreux systèmes de solvants pour chromatographie ont été décrits. Nous n'en retiendrons que quelques-uns.

1. *Séparation des bases puriques et pyrimidiques et des nucléosides correspondants.*

Le système de MARKHAM et SMITH (MARKHAM et SMITH, 1949) donne une très bonne séparation de ces divers composés (*n*-butanol saturé d'eau).

Quand la méthylcytosine est présente, le système de WYATT (WYATT, 1951) se révèle très supérieur (isopropanol : 170 ml, HCl concentré : 41 ml, eau distillée jusqu'à 250 ml).

2. *Séparation des nucléotides.*

Après hydrolyse d'un dinucléotide ou d'un trinucéotide par la phosphodiesterase du venin de serpent, on obtient, suivant les cas, un nucléo-

side, un nucléoside phosphate, un nucléoside diphosphate, le composé n'ayant pas été scindé. Nous avons cherché un système capable de séparer en une seule chromatographie ces divers constituants. Ce système, après une légère modification, est celui de MARKHAM et SMITH (MARKHAM et SMITH, 1955).

Solution saturée dans l'eau de sulfate d'ammonium . .	80 ml
Isopropanol	2 ml
Eau distillée	18 ml



FIGURE 2. — Chromatographie de l'hydrolysate d'un dinucléotide par la phosphodiesterase du venin de *C. adamanteus*. Durée de la chromatographie : 12 heures. (Solution saturée dans l'eau de sulfate d'ammonium = 80 ml ; isopropanol = 2 ml ; eau distillée = 18 ml.)

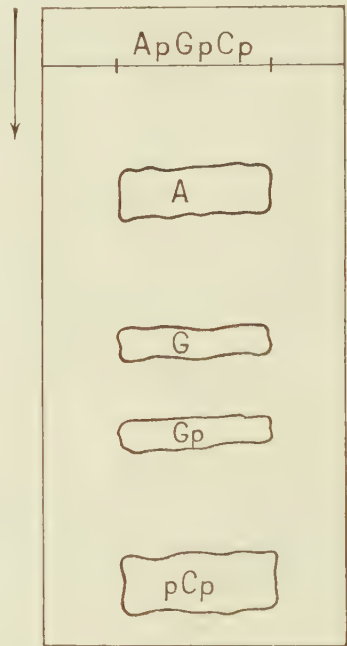


FIGURE 3. — Chromatographie de l'hydrolysate d'un trinucleotide par la phosphodiesterase du venin de *C. adamanteus*. Durée de la chromatographie : 12 heures. (Solution saturée dans l'eau de sulfate d'ammonium = 80 ml ; isopropanol = 2 ml ; eau distillée = 18 ml.)

Par ordre de R_F croissant pour les dérivés d'une même base, on observe la séparation du nucléoside, du nucléoside monophosphate, du nucléoside diphosphate. Les taches sont alors éluées : on en fait le spectre et on dose leur teneur en phosphore, ce qui permet de les identifier (fig. 2 et 3).

4) CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'ANIONS.

La chromatographie des dérivés des acides désoxyribonucléiques a surtout été étudiée par VOLKIN *et al.* et SINSHEIMER *et al.* (VOLKIN, KHYM, COHN, 1951 ; SINSHEIMER et KOERNER, 1951). COHN (1955, 1957) a passé en revue toutes ces méthodes, y compris celles concernant les acides ribonucléiques.

Nous allons décrire une des méthodes de chromatographie des désoxyribonucléotides. Comme résine échangeuse d'anions nous nous sommes servis de Dowex I-X₂ et Dowex I-X₈. Ces résines ont des degrés de pontage différents : X₂ = 2 %, X₈ = 8 % et sont utilisées sous forme de poudres fines 200-400 mesh, pour chromatographie.

La charge négative par molécule de nucléotide va croissant dans l'ordre suivant : acide cytidylique, acide thymidylique, acide adénylique, acide guanylique (désoxyribonucléotides). A des pH inférieurs à 1,5 ces nucléotides sont des cations. Si, par exemple, on les adsorbe à un pH supérieur à 2,5 sur du Dowex I, on peut les « désorber » théoriquement quand ils deviennent cationiques (pH inférieur à 1,5).

L'élution des nucléotides par HCl, éluant souvent utilisé, présente des inconvénients :

- manque de stabilité des composés nucléotidiques à des pH si bas,
- pour avoir une élution assez rapide il faut ajouter des ions Cl⁻ (sous forme de ClNa) et ensuite éliminer ces ions Na⁺, ce qui nécessite une opération supplémentaire.

L'utilisation de tampons acétate ou formiate d'ammonium à des pH plus élevés (de 4 à 7) s'est révélée meilleure. On peut en outre éliminer ces tampons par sublimation (COHN, 1950).

5) CHROMATOGRAPHIE D'UN HYDROLYSAT D'ADN.

Les résines utilisées (Dowex I-X₂ et Dowex I-X₈) sont traitées alternativement avec un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique et acétique 1 M puis avec de la soude 1 M (SINSHEIMER, 1954) jusqu'à diminution de la densité optique du filtrat à une valeur inférieure à 0,010 à 260 mμ. Vingt cycles environ sont nécessaires pour atteindre cette valeur. Ces résines sont ensuite équilibrées, avec du tampon acétate d'ammonium, à la molarité et au pH que l'on désire employer ultérieurement. Avec du tampon 0,1 M acétate d'ammonium, pH 4,5 (fig. 4), on élue d'abord les mononucléotides, à savoir : (d) Cp, Tp, (d) Ap, (d) Gp (le premier « pic » est constitué de nucléosides) ; le tampon 0,25 M désorbe les dinucléotides ; avec des tampons 0,5 M, 1 M, 2 M (fig. 11 et 13) il est possible d'éluer la totalité des polynucléotides par ordre de poids moléculaire croissant.

Les dinucléotides et trinucléotides, imparfaitement séparés par cette première chromatographie, sont soumis, après sublimation du tampon, à une seconde chromatographie sur colonne de Dowex I-X₈, 200-400 mesh, 1 × 20 cm. Cette résine possède un pouvoir de résolution plus élevé.

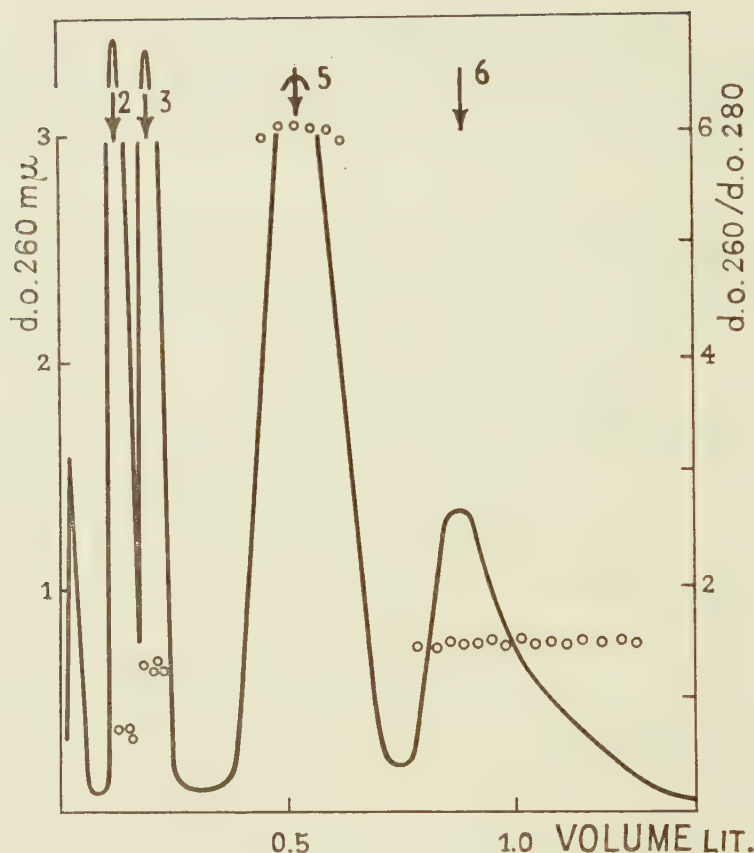


FIGURE 4. — Chromatographie d'un hydrolysate de 200 mg d'ADN du thymus par la DNase de *S. pyogenes* sur une colonne de Dowex 1-X₂, 200-400 mesh 1 × 10 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 4,5. Vitesse d'écoulement : 25 ml/h. La fraction 0,1 M (mononucléotides) est seulement représentée. « Pic » 2 : (d) Cp, « pic » 3 : Tp, « pic » 5 : (d) Ap, « pic » 6 : (d) Gp.

C) MÉTHODE DE CULTURE DE *STAPHYLOCOCCUS PYOGENES* EN FONCTION DE LA PRODUCTION DE DNase

Les différentes souches de *S. pyogenes* ne produisent pas des quantités équivalentes de DNase. Nous avons donc choisi une souche, la souche SAB, dont la production en cet enzyme soit importante (WECKMAN *et al.*, 1957 ; PRIVAT de GARILHE *et al.*, 1958) (voir tableau III).

Ces essais ont été effectués en cultivant les bactéries en tubes à essais, sans agitation. On voit que dans ce cas la quantité de DNase produite, dosée viscosimétriquement, est de 1 040 U. DNase/ml. Mais si au contraire on réalise une aération vigoureuse, il est possible d'atteindre 20 000 à 50 000 U. par ml.

TABLEAU III. — *DNase* produite par différentes souches de *S. pyogenes*.

Souche (*)	Unités DNase viscosimétriques par ml de culture
SAB	1 040
E 4 α	250
616 α	100
1 005 α	70
1 016 α	65
1 010 α	50
1 012 α	50
90 α	23
6 135 α	0
899 α	0
280 (non pathogène).....	0

Nous avons donc cherché à connaître, avec cette souche SAB, les conditions optima pour la production de DNase. Pour cela nous avons d'abord étudié la quantité de DNase produite en fonction de la croissance bactérienne (fig. 5). On remarque sur cette figure :

— qu'avec le bouillon « Brain Heart Infusion », milieu de culture employé, on peut atteindre une croissance bactérienne très élevée ;

— que la phase exponentielle est longue et bien définie, autrement dit que le taux de croissance est constant ; la chute de concentration de l'aliment limitant se fait sentir par une diminution brutale de la croissance ;

— que le nombre d'unités viscosimétriques de DNase dans le milieu de culture suit, mais avec un certain retard, la courbe de croissance bactérienne. Lorsque celle-ci est terminée, la concentration en DNase tend à baisser. Il faudra donc, une fois la phase exponentielle terminée, commencer immédiatement la précipitation au sulfate d'ammonium, ce qui est le premier stade de la purification de cet enzyme ;

— que la production de DNase est exocellulaire ;

— la courbe en pointillé rend compte de la croissance de *S. pyogenes* lorsque, après 6 heures de culture, on ajoute au milieu du pyrophosphate de sodium et du glycolle aux concentrations respectives de 0,8 % et 1 M (SALMON, 1952). On observe alors après 12 heures une chute de la densité optique : il y a lyse des bactéries. La courbe donnant le nombre d'unités viscosimétriques par ml de bouillon suit sensiblement celle de la croissance : la lyse des bactéries s'accompagnerait d'une libération d'ADN sur lequel la DNase se fixerait immédiatement, d'où cette chute en activité.

Le second problème que nous avons essayé de résoudre est la production d'un grand volume de milieu de culture, la quantité de DNase exprimée en mg étant toujours très faible, tout en réalisant une agitation aussi vigoureuse que possible.

(*) A part la souche SAB qui nous a été fournie par le Dr CUNNINGHAM et qui est pathogène, les souches mentionnées dans ce tableau font partie de la collection de l'Institut Pasteur ; elles sont toutes pathogènes sauf la souche 280 et produisent, selon les cas, une toxine hémolytique α (hémolysine α) ou une toxine hémolytique β (hémolysine β).

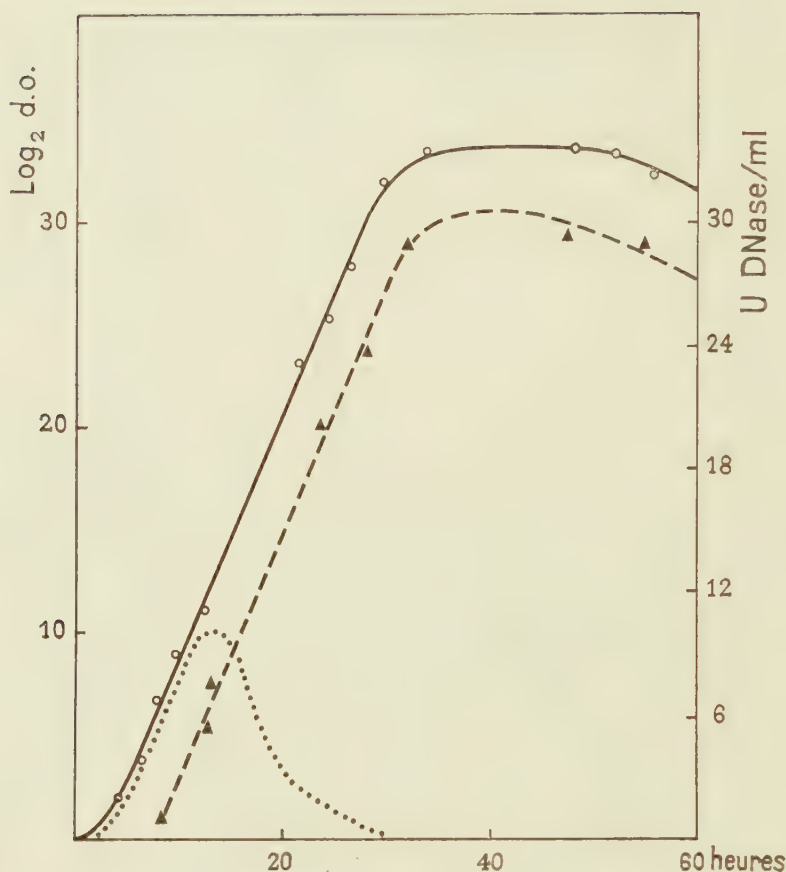


FIGURE 5. — Courbe de croissance de *S. pyogenes*. La courbe en traits pleins représente la croissance de *S. pyogenes* à 30° sur bouillon « Brain Heart Infusion » (Difco). Une aération vigoureuse est réalisée au moyen d'un turbo-agitateur.

La courbe en traits discontinus rend compte du nombre d'unités viscosimétriques en DNase par ml de milieu de culture.

Après 6 heures de culture (courbe en pointillés), on ajoute au milieu du pyrophosphate (0,8 %) et du glycolate (1 M).

Seize litres de bouillon 037 Difco Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) sont vigoureusement aérés par un turbo-agitateur (fig. 6). Cet appareil tournant à grande vitesse pulvérise de fines bulles d'air dans le liquide qu'il brasse. Son axe passe au travers du bouchon qui ferme le récipient de culture : il faut donc maintenir une surpression d'air stérile afin d'éviter toute contamination. De l'eau distillée est ajoutée afin de compenser les pertes de liquide dues à l'évaporation. On est obligé de mettre des grandes quantités d'antimousse (Si Antimousse AF en émulsion, Saint-Gobain, licence Dow Corning Corp.). La température est maintenue constante à 30° à l'aide d'un bain-marie. Cette température est optimale pour la production de DNase,

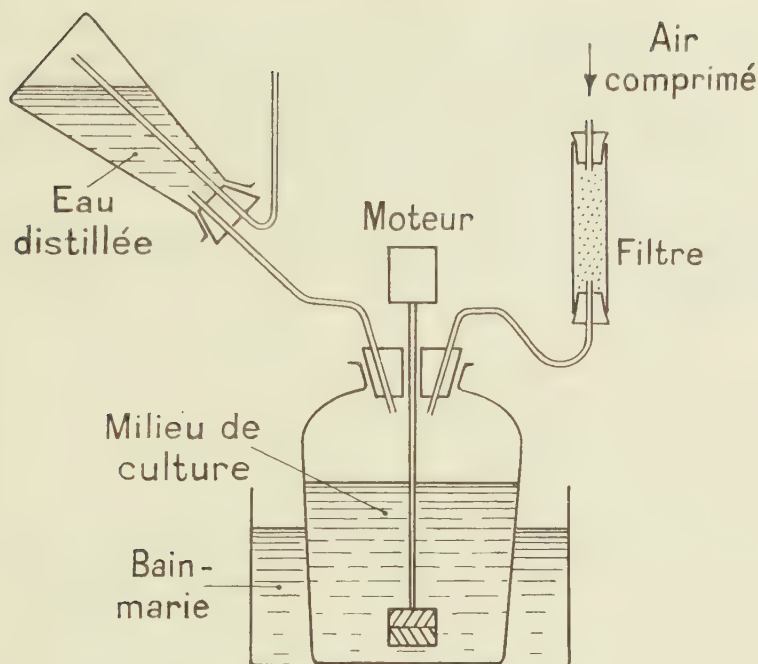


FIGURE 6. — Schéma du montage des divers appareils pour la culture de *S. pyogenes*.

Après 40 heures de culture, les bactéries sont éliminées par centrifugation à la « sharples » (50 000 tmn) et le culot bactérien est rejeté. L'activité en DNase est dosée (20 000 à 30 000 U. Vis./ml) et le bouillon soumis au premier stade de la purification.

D) QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE DES ENZYMES NUCLÉOLYTIQUES

Nous ne parlerons ici que des méthodes employées au cours de ce présent travail.

1. DOSAGE DES DÉSOXYRIBONUCLÉASES.

1. Dosage par la méthode spectrophotométrique de Kunitz (KUNITZ, 1950).

KUNITZ avait remarqué que l'action d'une DNase sur un ADN s'accompagnait d'une augmentation de densité optique à 260 $\text{m}\mu$. Cette augmentation était proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée, et linéaire en fonction du temps au début de la réaction (fig. 7).

Processus expérimental.

a) Solution de base de désoxyribonucléate de sodium à 2 mg par ml. Cette solution se conserve plusieurs mois à la glacière.

b) Substrat pour le dosage spectrophotométrique : 2 ml de solution de base de DNase de sodium + 10 ml de MgSO_4 — 0,05 M + 10 ml de tampon acétate de sodium 1 M, pH 5,0.

Ces conditions ne sont évidemment valables que pour la DNase pancréatique. Elles doivent être modifiées de façon à se placer dans les conditions optimales d'activité enzymatique.



FIGURE 7. — Dosage de la DNase de *S. pyogenes* par la méthode spectrophotométrique de KUNITZ à pH 8,6 en présence d'ions Ca^{++} à la concentration finale de $3,3 \times 10^{-3}$ M. Les différentes courbes correspondent à des concentrations variables en enzyme.

Mesures.

Plusieurs tubes à essai contenant chacun 3 ml de solution de substrat sont placés pendant quelques minutes dans un bain-marie à 25°. On ajoute 1 ml d'eau à l'un de ces tubes dont on transfère le contenu dans une cuve en quartz. Une prise de 1 ml de la solution enzymatique contenant 5 à 10 μg d'enzyme est ajoutée à un autre tube tandis que l'on déclenche un chronomètre. Cette seconde solution est versée dans une autre cellule en quartz. On lit l'augmentation de la densité optique à 260 $\mu\mu$ à intervalle de temps régulier (toutes les minutes, par exemple). Cette augmentation doit être de l'ordre de 0,005 à 0,02 par minute, lue dans un spectrophotomètre Beckman D.U.

L'unité d'activité est la quantité d'enzyme, exprimée en mg, capable de provoquer une augmentation de densité optique à 260 $\mu\mu$ de 1,000 par minute.

Dosage de la DNase de S. pyogenes.

Temps en mn	d.o. 260 mμ	Δ d.o. 260 mμ
1	25	15
2	40	14
3	54	16
4	70	16
5	86	14
6	100	13
7	113	15
8	128	

Ce dosage est réalisé à pH 8,6, à 20°, en présence d'ion Ca^{++} à la concentration finale de $3,3 \times 10^{-3}$ M.

Δ d.o. moyenne par minute à 260 mμ = 0,014.

Concentration en enzyme (mg) = 0,0002 mg.

$$\frac{0,014}{0,0002} = 70 \text{ U. DNase/mg.}$$

Remarques. — 1. Cette méthode n'est applicable que lorsqu'on dispose d'extraits enzymatiques déjà très purifiés : il faut que l'absorption due à la solution à doser soit faible ; 2. cette méthode n'est pas aussi sensible que la méthode viscosimétrique.

2. Dosage par la méthode viscosimétrique (LASKOWSKI et SEIDEL, 1945).

Cette méthode est très sensible : des dilutions au 1/1 000 000 des solutions enzymatiques sont souvent nécessaires. Mais elle demande beaucoup plus de temps que la méthode spectrophotométrique.

Processus expérimental.

Nous avons légèrement modifié la méthode de dosage de LASKOWSKI et SEIDEL afin de l'adapter au cas de la DNase de *S. pyogenes* :

2 ml d'une solution d'ADN, à 2 mg par ml, sont placés dans un viscosimètre d'Ostwald immergé dans un bain-marie à 37°. Cette solution d'ADN est préparée de la façon suivante :

- ADN 0,2 % 50 ml
- Tampon borate, pH 8,6, 0,1 M 49 ml
- Ca^{++} (chlorure) 1 M 1 ml

L'extrait enzymatique à doser est dilué jusqu'à obtenir une concentration convenable. Au moment où on ajoute rapidement cette solution

à celle d'ADN dans le viscosimètre, on déclenche le chronomètre afin de mesurer la viscosité au temps zéro. Dans les 30 minutes qui suivent, on fait des mesures de viscosité toutes les 5 minutes.

La constante de viscosité d'une réaction monomoléculaire est donnée d'après la formule :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{\eta_0}{\eta_t}$$

t = temps
 η_0 = viscosité au temps 0
 η_t = viscosité relative au temps t

L'unité de DNase est la quantité d'enzyme qui donne une valeur de $K = 1,0 \times 10^{-3}$.

Dosage viscosimétrique de la DNase de S. pyogenes.

	Incubation (mn)	Ecoulement (s)	Viscosité relative	$\frac{\eta_0}{\eta_t}$	$\log. \frac{\eta_0}{\eta_t}$	K
Eau	-	40	1,00			
ADN + enzyme	0	132	3,3	—	—	
	5	116,5	2,9	1,14	0,0559	0,0112
	10	100	2,5	1,32	0,120	0,0120
	15	90	2,24	1,47	0,167	0,0140
	20	83	2,08	1,59	0,201	0,0100
	25	79	1,97	1,67	0,222	0,0089
	30	74	1,85	1,78	0,250	0,0084
Moyenne	—	—	—	—	—	0,0102

Calcul du nombre d'unités connaissant $K : 0,0102 \times 10^{-3} = 10,2$. Ce chiffre représente le nombre d'unités viscosimétriques par ml de la solution à doser (sans tenir compte du facteur de dilution).

Pour avoir la valeur réelle du nombre d'unités viscosimétriques par ml, il faut multiplier cette valeur par celle de la dilution. Dans le cas présent : $10,2 \times 25\ 000 = 25\ 500$ U. par ml.

II. DOSAGE DE LA RNase.

1. Méthode spectrophotométrique (Kunitz, 1946).

KUNITZ avait remarqué que l'hydrolyse de l'ARN de levure s'accompagnait d'une chute de la densité optique à 300 m μ , d'où le principe du dosage décrit ci-dessous. La densité optique diminue linéairement avec le temps au début de la réaction, et cette diminution est proportionnelle à la quantité d'enzyme.

L'unité RNase est la quantité d'enzyme qui provoque une chute de 100 % de la valeur $E_0 - E_f$ à 25° (E_0 = densité optique au temps t ; E_f = densité optique finale).

Processus expérimental.

On mélange rapidement 2 ml d'une solution d'ARN à 0,1 %, dans du tampon acétate d'ammonium 0,05 M, pH 5,0, avec 2 ml de la solution

d'enzyme, amenée à la dilution voulue, tout en déclenchant un chronomètre. La solution obtenue est versée dans une cuvette en quartz. On fait des lectures à 300 m μ , à des intervalles de temps réguliers (toutes les minutes par exemple) pendant 5 à 10 minutes environ.

L'activité RNase est donnée par la relation :

$$\frac{\Delta E \text{ par mn}}{E_0 - E_f}$$

ΔE = différence moyenne de densité optique entre deux lectures consécutives.

$E_0 - E_f$ = différence de densité optique entre la solution de départ et la solution finale après action de la RNase.

2. Méthode dite du « phosphore soluble » (Northrop, Kunitz et Herriot, 1948).

Après action d'un enzyme nucléolytique sur un acide nucléique, des coupures se produisent avec libération d'oligonucléotides de faible poids moléculaire. Ceux-ci ne sont pas précipitables en solution acide. On dose le phosphore dans cette fraction.

Processus expérimental.

Des tubes contenant 0,5 ml d'une solution d'ARN de levure à 2 %, dans du tampon au pH voulu, et 0,5 ml de la solution enzymatique à étudier, sont placés dans un bain-marie à 25° pendant 10 minutes. On ajoute 10 ml d'acide acétique glacial, puis on filtre. Le phosphore est dosé dans ce filtrat (sur une prise donnée) par une méthode classique (FISKE et SUBBAROW, 1925).

Une autre méthode dérivant du même principe est celle de KALNITSKY *et al.* (KALNITSKY *et al.*, 1959).

Les tubes à doser contiennent 1 ml de tampon 0,1 M au pH désiré + 0,01 ml de la solution dont on veut déterminer l'activité en RNase. A chacun de ces tubes est ajouté 1 ml d'une solution à 1 % d'ARN de levure. On incube pendant 4 minutes à 37°. On précipite le RNA de haut poids moléculaire par 1 ml d'une solution d'acétate d'uranyl à 0,75 % dans l'acide perchlorique à 30 %. On centrifuge. On prélève 0,1 ml du surnageant que l'on dilue avec 3 ml d'eau. On lit à 260 m μ .

Dosage de la RNase pancréatique (pH = 7,0)

$\mu\text{g RNase}$	d.o. 260 m μ	Δ d.o. 260 m μ
0	375	385 595 737
4	750	
8	960	
12	1 112	

III. DOSAGE DE LA PHOSPHODIESTÉrase (PRIVAT DE GARILHE et LASKOWSKI, 1955).

Nous ne décrivons pas ici la préparation du substrat (YOSHIDA, 1941). Ce dosage est basé sur la libération par la phosphodiesterase du *p* : nitrophénol à partir du Ca [bis (*p* - nitrophényl - phosphate)]₂. Cette libération est mesurée directement au spectrophotomètre muni d'une chambre à température constante (37°), à 440 mμ.

Dans une cuvette on mesure :

— 1 ml de tampon glycine NaOH, pH 8,6, 0,3 M ;

— 1,5 ml d'une solution de Ca [bis (*p* - nitrophényl - phosphate)]₂ 0,001 M.

Indépendamment, on chauffe la solution de l'enzyme à étudier : on en ajoute 0,5 ml dans la cuvette où se trouve déjà le substrat tandis que l'on déclenche le chronomètre. On fait des mesures toutes les 3 minutes. La réaction est linéaire en fonction du temps, au début de la réaction tout au moins. Il y a proportionnalité entre la quantité d'enzyme et la libération de *p* : nitrophénol.

On mesure la quantité de phosphodiesterase par l'augmentation de densité optique à 440 mμ par 3 minutes. Une unité de phosphodiesterase est définie comme :

$$\Delta E_{440/3 \text{ mn}} = 1,0$$

Le venin de *Crotalus adamanteus*, utilisé dans les expériences décrites dans ce présent travail, contient environ 0,047 U. par mg.

IV. DOSAGE DE LA 5' NUCLÉOTIDASE DU VENIN DE SERPENT (PRIVAT DE GARILHE et LASKOWSKI, 1955).

Ce dosage est basé sur la libération du phosphate minéral à partir de l'adénosine 5' phosphate du muscle. La quantité de phosphate se trouvant sous forme minérale, après action de la 5' nucléotidase, est dosée par la méthode de FISKE et SUBBAROW (FISKE et SUBBAROW, 1925).

Mode opératoire.

Dans un tube à essai, on mesure 0,2 ml de solution enzymatique, 0,1 ml de MgSO₄ — 0,3 M et 0,4 ml de tampon glycine — NaOH 0,3 M — pH 9,0. On place ensuite ce tube au bain-marie à 37°. On ajoute 0,3 ml de solution d'adénosine 5' monophosphate 0,01 M et on attend 15 minutes. On traite immédiatement par 10 ml de réactif molybdique et 1 ml de liqueur réductrice de FISKE et SUBBAROW.

L'unité de phosphodiesterase est la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser une μmole d'AMP par heure.

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS EN TANT QUE PROTEINE DE LA DNase DE *S. PYOGENES*

CHAPITRE I

PURIFICATION DE LA DNase DE *S. PYOGENES*

Parmi les différentes méthodes de purification, nous avons recherché celles ayant un rendement élevé. En effet, les quantités produites exprimées en mg de cet enzyme sont extrêmement faibles. Nous avons donc systématiquement éliminé tout processus expérimental (chromatographie sur D.E.A.E. cellulose par exemple) qui, bien qu'augmentant de façon considérable l'activité spécifique, n'avait pas un rendement suffisant (50 % environ).

D'autre part, certaines méthodes, bien que répondant à cette condition (tableau IV) se sont révélées trop brutales (précipitation alcoolique par exemple) : au dernier stade de la purification (fig. 8), on obtenait, par chromatographie sur Amberlite, la résolution de l'activité en deux « pics » protéiques distincts bien qu'ayant la même activité spécifique. Ce fait, comme le montre la suite de ce présent travail, peut s'expliquer par une désamidation partielle de la molécule.

I. PREMIÈRES ÉTAPES DE LA PURIFICATION

Il s'agit de la préparation d'une substance qui servira ensuite de point de départ à la chromatographie sur colonne telle qu'elle est décrite dans le paragraphe suivant.

1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

Une quantité de liquide de 6 litres environ, obtenue après centrifugation des bactéries, et qui renferme 25 000 unités viscosimétriques par ml, est soumise à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, après avoir ajusté le pH de cette solution, avec de la soude (tableau 5) à 8,5. On effectue cette opération à 5° environ. Entre chaque stade, on laisse à la chambre froide pendant deux jours.

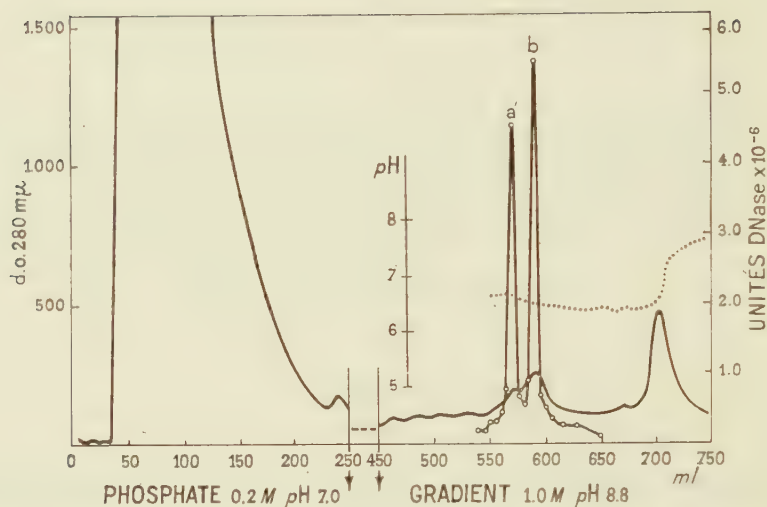


FIGURE 8. — Chromatographie de la DNase de *S. pyogenes* sur une colonne d'Amberlite IRC 50 XE 64, 200-400 mesh, 2×30 cm. L'éluant est du phosphate de sodium aux concentrations et pH indiqués. Les traits pleins représentent la densité optique à 280 mμ, les deux « pics » a et b l'activité en DNase et les pointillés les pH.

TABEAU IV. — Schéma de purification de la DNase de *S. pyogenes*.

Etapas de la purification	Poids des fractions (mg)	Unités DNase totales 10^{-6}	U/mg	Enrichissement	Rendement p. 100
Précipité $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	32 000	54,0	1 700	1	100
Poudre après précipitation alcoolique..	1 700	56,0	33 000	19,5	100
Pic a	31,2	13,8	455 000	267	25,6 } 55,6 30,0 }
Pic b	31,0	16,1	520 000	306	

TABEAU V. — Schéma de précipitation fractionnée en sulfate d'ammonium.

% de saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Unités viscosimétriques $\times 10^{-6}$	Poids des fractions	Unités/mg	Enrichissement	Rendement total %
Liquide de culture 0 %	156	240 000	650	1	
A : 60 % - 65 % ..	32	10 000	2 960	4,5	
B : 65 % - 70 % ..	73	9 650	7 560	11,6	
C : 70 % - 80 %...	40	15 600	2 565	3,9	93 %

TABLEAU VI. — *Schéma de dialyse.*

N° des fractions	Unités viscosi- métriques $\times 10^{-6}$	Poids des fractions (mg)	Unités/mg	Enrichis- sement	Rendement total %
A	27,5	2 780	9 990	15,4	—
B.....	48,5	2 720	17 800	27,4	—
C	33,5	1 680	19 900	30,6	76

La presque totalité de l'activité précipite entre 60 % et 80 % de saturation en sulfate d'ammonium, avec un rendement de 93 %.

2. Dialyse.

Chacune des fractions A, B, C est redissoute dans un minimum d'eau distillée afin d'avoir une dialyse aussi efficace que possible. Celle-ci a une durée de 24 heures contre 10 litres d'eau distillée, les boyaux de dialyse étant soumis à une agitation lente. On réalise cette opération deux fois (tableau VI).

On remarque que la DNase de *S. pyogenes* est légèrement dialysable mais l'activité contenue dans le dialysat est toujours inférieure à 25 %. On réunit ces trois fractions A, B, C que l'on concentre sous vide et que l'on lyophilise. On obtient ainsi 7 g d'une poudre fortement colorée en brun. C'est cette substance qui sert de base à la chromatographie sur colonne d'Amberlite.

II. CHROMATOGRAPHIE SUR AMBERLITE IRC 50 XE 64

a) *Généralités.* — Nous avons observé que la DNase de *S. pyogenes* s'adsorbe assez bien sur Amberlite IRC 50 XE 64, à des pH compris entre 6 et 7. L'enzyme adsorbé peut être ensuite aisément élué en créant un gradient de force ionique et de pH. L'avantage de commencer la chromatographie à pH 6,0 est que l'adsorption de la DNase est plus quantitative qu'aux pH élevés, mais, par contre, des quantités importantes d'impuretés se trouvent fixées sur la colonne. A pH 7,0 une certaine partie de la DNase traverse la colonne sans rétention, mais le produit obtenu est finalement plus pur. Nous avons donc pris un pH intermédiaire de 6,8.

b) *Description d'une expérience.* — L'Amberlite IRC 50 XE 64, 200-400 mesh, utilisée pour la chromatographie, est préparée selon la méthode de HIRS *et al.* (1953), à cette différence près qu'elle est équilibrée avec du tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8 (phosphate monosodique 0,2 M + phosphate disodique 0,2 M). On dissout 3,6 g de la substance obtenue après dialyse dans 25 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8, et on verse la solution obtenue sur une colonne de 2×30 cm d'Amberlite équilibrée

avec le même tampon. Cette colonne est montée sur un collecteur de fractions et comporte un mélangeur fermé en vue de créer plus tard un gradient de pH et de force ionique. On recueille des fractions de 5 ml et on mesure la concentration en protéines par des lectures spectrophotométriques à 280 m μ . La plus grande partie du matériel absorbant à 280 m μ sort de la colonne, sans subir aucune rétention, en entraînant une quantité minime de DNase. Lorsque la densité optique est retombée à une valeur très faible et constante, après la sortie du premier « pic », on crée un gradient de concentration et de pH en ajoutant dans le mélangeur de l'appareil une solution molaire du phosphate disodique. (En fait, le phosphate disodique n'est pas soluble à 20° à la concentration de 1 M : on utilise une solution saturée à 20°.) La solution de phosphate disodique est à pH 8,8. On observe alors, dans la deuxième phase de la chromatographie, l'élution d'un « pic » ayant une activité considérable en DNase. Ce « pic » s'est révélé être homogène (fig. 9).

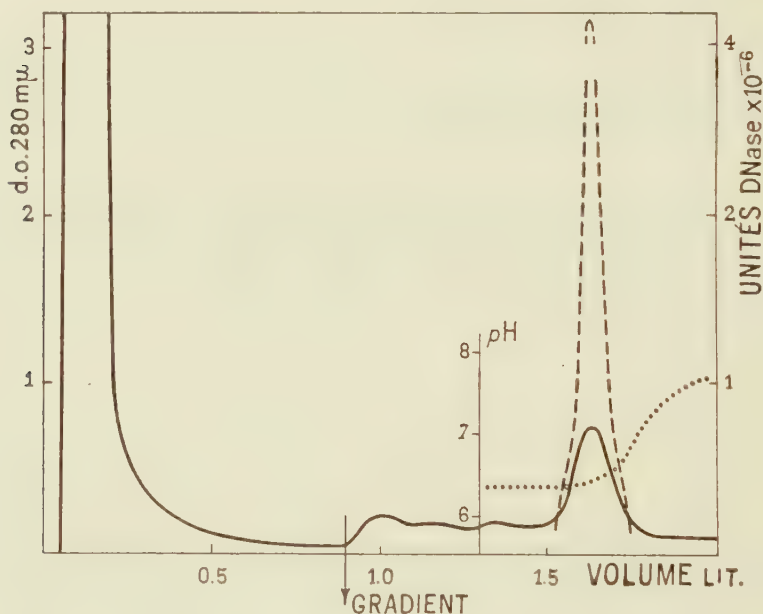


FIGURE 9. — Chromatographie de la DNase de *S. pyogenes* sur une colonne d'Amberlite IRC 50 XE, 64, 200-400 mesh, 2 × 30 cm. L'éluant est du phosphate de sodium pH 6,8 - 0,2 M. On crée le gradient avec une solution saturée de phosphate disodique (20°). Les traits pleins représentent la densité optique à 280 m μ , les traits discontinus l'activité en DNase, les pointillés les variations de pH.

Après dialyse et lyophilisation de ce « pic » protéique, on dose aussi l'activité en DNase par la méthode spectrophotométrique : 80 U. DNase par mg. A titre de comparaison, disons que l'activité de la désoxyribonucléase pancréatique cristallisée par KUNITZ est de 10 U. DNase par mg.

Au cours de cette purification (tableau VII), on remarque que le nombre d'unités viscosimétriques par mg a été multiplié par 4 500.

TABLEAU VII. — Schéma de purification.

Etapes de la purification	Poids des fractions (mg)	Unités viscosim. DNase $\times 10^{-6}$	Unités viscos./mg	Enrichissement	Rendement %
Liquide de culture.	222 000	156	650	1	100
Précipité $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	36 000	145	4 027	6,2	93
Dialyse	7 180	110	15 300	23,4	76
Chromatographie (*)	10	29	2 900 000	4 450	50

(*) 60 millions d'unités viscosimétriques utilisées seulement.

III. DOSAGE D'AUTRES ACTIVITÉS NUCLÉASIQUES DANS LES FRACTIONS « DNase »

Nous avons recherché s'il n'existait pas des activités ribonucléasiques, phosphodiésterasiques, dans les différentes fractions obtenues au cours de la purification. En effet, de nombreuses souches de *S. pyogenes* sont connues pour produire des ribonucléases.

1. *Activité en RNase.*

Le tableau VIII montre clairement que :

a) L'activité RNasique contenue dans la fraction « DNase », obtenue après chromatographie, est extrêmement faible : dans la proportion de 1 à 400 environ ;

b) L'activité RNasique est due à un enzyme distinct de la « DNase » puisque le rapport des deux activités DNase/RNase n'est pas constant. Ce rapport est plus faible (quantité de RNase plus grande) dans les premiers stades de la purification. Nous nous permettons d'insister sur ce point, de nombreux auteurs (CUNNINGHAM, 1959 ; REDDI, 1959) ayant trouvé que la « DNase » de *S. pyogenes* était aussi une RNase. Les résultats que nous donnons sont obtenus dans des conditions normales : temps d'action de l'enzyme sur le substrat et quantité d'enzyme étant ceux habituellement employés avec les méthodes de dosages décrites dans la première partie de ce travail. Il est possible qu'avec un temps de réaction enzyme-substrat très long et une quantité d'enzyme très grande, la DNase de *S. pyogenes* provoque des coupures dans les chaînes polynucléotidiques de l'ARN. On ne se trouve plus alors placé dans des « conditions enzymatiques ».

TABLEAU VIII. — 1. *Activité en RNase dans les différentes fractions « DNases ».*

Etapas de la purification	Unités spectrophotométriques par mg	Unités spectrophotométriques par rapport à DNase I crist.	Activité RNase par rapport à l'activité RNase crist. (*)	DNase
				RNase
Précipité au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$...	2,3	0,23	0,006	58
Substance obtenue après chromatographie	40	4	0,033	122
Substance obtenue après chromatographie	80	8	0,02	400
Substance obtenue après chromatographie (**)...	24	2,4	0,05	40

(*) Méthode de dosage selon KALNITSKY *et al.* (1959).

(**) Il s'agit d'une autre souche bactérienne de *Staphylococcus pyogenes*.

2. *Activité en phosphodiesterase.*

Nous n'avons remarqué aucune libération de *p* : nitrophénol à partir du Ca [bis (*p* - nitrophényl - phosphate)]₂. La DNase de *S. pyogenes* ne possède pas cette activité, si on se place, comme nous venons de le dire, dans des conditions normales de dosage.

CHAPITRE II

INHIBITION ET ACTIVATION DE LA DNase DE *S. PYOGENES* PAR DIFFÉRENTS AGENTS CHIMIQUES

Les expériences décrites dans ce chapitre ont été réalisées à l'aide de l'enzyme purifié par chromatographie. Ces préparations contiennent de 40 à 80 U. DNase/mg. L'activité en DNase en présence de différents agents inhibiteurs ou activateurs, a été dosée par la méthode spectrophotométrique de KUNITZ (KUNITZ, 1954).

Avant d'aborder cette étude, nous donnons une courbe de l'activité DNasique en fonction du pH (fig. 10). Le même tampon à des pH différents a toujours été utilisé : Tris (hydroxyméthyl aminométhane) — HCl. L'optimum de pH est très étalé : il va de 8,5 à 9,1 environ. A des pH inférieurs à 7 ou supérieurs à 10, l'activité, dans des conditions normales de dosage, est très faible, sinon nulle. On peut définir le pH optimum comme étant de 8,6.

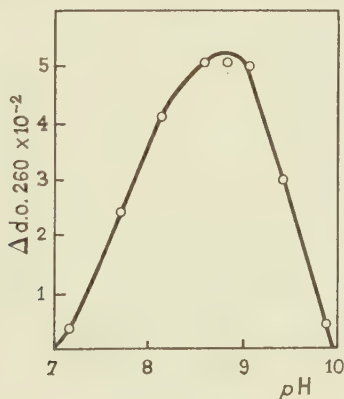


FIGURE 10. — Courbe représentant l'activité de la DNase de *S. pyogenes* en fonction du pH . Cette activité est donnée en ordonnée par la variation de la densité optique à 260 $m\mu$ (dosage spectrophotométrique).

TABLEAU IX. — *Inhibition par les agents réducteurs.*

Addition M	Activité (U. DNase/mg)	Activité relative
Rien	33	1,00
Cystéine $3,3 \times 10^{-3}$	24	0,73
$6,6 \times 10^{-3}$	12	0,36
Rien	29	1,00
Glutathion $3,3 \times 10^{-3}$	13	0,45
$8,4 \times 10^{-4}$	23	0,79
Rien	34	1,00
métabisulfite $3,3 \times 10^{-3}$	7,5	0,22
($S_2O_5Na_2$) $1,6 \times 10^{-3}$	16	0,47
$3,3 \times 10^{-4}$	25	0,73
$8,3 \times 10^{-4}$	23,8	0,70
Rien	27	1,00
Acide thioglycolique $1,6 \times 10^{-3}$	27	1,00
$3,3 \times 10^{-3}$	27	1,00
5×10^{-3}	23	0,85

Le tableau IX met en évidence l'action très nettement inhibitrice, sauf dans le cas de l'acide thioglycolique, des agents réducteurs.

TABLEAU X. — *Inhibition par les agents de chélation.*

Addition M	Activité DNase U./mg	Activité relative
Rien	27	1,00
Citrate de sodium : $1,6 \times 10^{-3}$	0	0
$1,6 \times 10^{-4}$	12	0,44
$8,4 \times 10^{-5}$	19	0,70
Rien	27	1,00
Versène (*) : $8,3 \times 10^{-5}$	0	0
$1,66 \times 10^{-6}$	14	0,52
$4,1 \times 10^{-6}$	11	0,40
$4,1 \times 10^{-6} + 3,3 \times 10^{-2} Ca^{++}$	21	0,78

(*) Acide éthylène diamine tétraacétique.

On remarque que la DNase de *S. pyogenes* est très sensible à tous les agents qui complexent les métaux lourds. Comme le montre le tableau X, il est possible de retrouver une partie de l'activité, en ajoutant des ions Ca^{++} en quantité assez importante, la concentration en versène étant de $4,1 \times 10^{-6}$.

TABLEAU XI. — *Activation par les sels de Calcium.*

Addition M	Activité DNase U./mg	Activité relative
Rien	3,7	1,00
Ca ⁺⁺ (sous forme de chlorure) :		
1 $\times 10^{-4}$	4,8	1,27
8,3 $\times 10^{-4}$	8,4	2,26
1,66 $\times 10^{-3}$	8,4	2,26
3,3 $\times 10^{-3}$	8,6	2,32
6,6 $\times 10^{-3}$	6,5	1,78
1,5 $\times 10^{-2}$	0,6	0,16

Comme le montre le tableau XI, l'activité en DNase passe par un maximum pour une concentration donnée en ions Ca⁺⁺. Il est intéressant de remarquer que si la concentration en ions calcium est trop élevée, leur action devient inhibitrice.

TABLEAU XII. — *Inhibition par d'autres cations divalents.*

Addition M	Activité DNase U./mg	Activité relative
Rien	24	1,00
Cobalt Co ⁺⁺ : 8,3 $\times 10^{-4}$	10	0,42
Cuivre Cu ⁺⁺ : 1,6 $\times 10^{-4}$	16	0,67
Magnésium Mg ⁺⁺ : 1,66 $\times 10^{-3}$	7,2	0,30
Rien	25	1,00
Zinc Zn ⁺⁺ : 8,5 $\times 10^{-5}$	2,4	0,09
Fer Fe ⁺⁺ : 1,66 $\times 10^{-3}$	2,7	0,10
Manganèse Mn ⁺⁺ : 1,66 $\times 10^{-5}$	2,8	0,11
Nickel Ni ⁺⁺ : 8,3 $\times 10^{-4}$	1,6	0,06
Baryum Ba ⁺⁺ : 8,3 $\times 10^{-4}$	1	0,04

Il est intéressant de voir que des métaux appartenant au même groupe que le calcium, comme le baryum, ont une action inhibitrice très marquée (tableau XII).

DISCUSSION

Nous voudrions attirer l'attention sur les deux points suivants :

En tant que protéine, la DNase de *S. pyogenes* est caractérisée par une grande thermostabilité. En effet, aux environs de pH 8,6, une solution de DNase (se trouvant encore à l'état très impur), plongée au bain-marie bouillant pendant 15 minutes, ne voit pas son activité diminuer. Nous

avons, dans des essais préliminaires, utilisé cette propriété pour tenter d'éliminer les dernières bactéries restant dans le milieu de culture après centrifugation.

Le second point intéressant est le fait que certaines observations nous ont conduit à penser que cette DNase avait un faible poids moléculaire. En effet, 20 % environ de l'activité est dialysable contre de l'eau distillée. D'autre part, cet enzyme n'est pas dénaturé à des concentrations de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (dilution nécessaire pour le dosage spectrophotométrique des fractions obtenues après chromatographie). Les protéines de haut poids moléculaire perdent généralement leur activité à des concentrations si faibles.

DÉSOXYRIBONUCLÉOTIDES PRODUITS PAR ACTION DE LA DNase DE *S. PYOGENES* SUR DIFFÉRENTS ADN

Comme nous l'avons montré précédemment, les désoxyribonucléases connues actuellement hydrolysent les acides désoxyribonucléiques avec production d'oligonucléotides. Ces fragments nucléotidiques sont caractéristiques de chacun de ces enzymes. D'où la définition d'une spécificité que nous avons aussi tenté d'établir pour la DNase de *S. pyogenes* en définissant la structure des différents polynucléotides.

On peut distinguer deux étapes dans cette étude :

a) On commence par hydrolyser une quantité déterminée d'ADN au pH optimum de l'enzyme, puis on chromatographie cet hydrolysate sur une colonne de Dowex I-X₂ ; les différents « pics » nucléotidiques qui sortent de cette colonne, à l'état impur, sont de nouveau chromatographiés sur du Dowex I-X₈ dont le pouvoir de résolution est plus grand. On obtient ainsi les différents nucléotides à l'état pur.

b) On cherche ensuite à connaître leur structure, ce qui pour les mononucléotides est relativement simple : spectre, afin d'identifier la base purique ou pyrimidique, action de 5' nucléotidase, pour déterminer la position du groupement phosphoryle sur le désoxyribose. Les dinucléotides et trinucléotides sont hydrolysés par la phosphodiesterase du venin de *Crotalus adamanteus* et cet hydrolysate chromatographié sur papier. On sépare ainsi les divers composés obtenus, que l'on peut alors identifier.

A) HYDROLYSE DES ADN

On réalise cette hydrolyse à la température de 37°. 200 mg d'ADN du thymus, par exemple, sont mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée, dans un petit bécher où plonge l'électrode d'un pH-mètre et la tige d'un agitateur mécanique. Une fois l'équilibre de température atteint, on ajoute 0,1 ml d'une solution molaire de chlorure de calcium et une unité spectrophotométrique de DNase. On ajuste le pH avec de la soude 0,1 N à 8,6, pH optimum d'action de cet enzyme. Au fur et à mesure de l'hydrolyse, l'ADN se dissout avec production de groupements acides : il faut donc maintenir le pH constant. Dix unités spectrophotométriques de DNase sont nécessaires pour ne plus observer de diminution de pH. On

considère alors l'hydrolyse comme terminée. Le temps demandé est de 5 à 6 heures. On centrifuge cet hydrolysate afin d'éliminer les dernières traces des protéines (2 à 3 mg) que contenait encore l'ADN.

B) CHROMATOGRAPHIE SUR DES COLONNES DE DOWEX I-X₂ ET DOWEX I-X₃ DE L'HYDROLYSAT

La solution obtenue précédemment est rendue alcaline (pH 9) avec de la soude (cette précaution est indispensable si l'on veut avoir une bonne adsorption) et versée sur une colonne de Dowex I-X₂ 200-400 mesh, 1 × 10 cm, équilibrée avec du tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 4,5. On recueille des fractions de 10 ml, à raison de 2 à 3 par heure. On mesure la densité optique de ces fractions à 260 mμ et 280 mμ au spectrophotomètre. Quand, avec du tampon 0,1 M on observe que la densité optique à 260 mμ est retombée à une valeur très faible (0,025) et ceci pour 30 fractions environ, on continue l'élution avec du tampon 0,25 M, puis 0,5 M, 1 M, 2 M. Il faut environ 600 fractions et 10 à 15 jours de chromatographie pour éluer tout le matériel absorbant à 260 mμ (fig. 11).

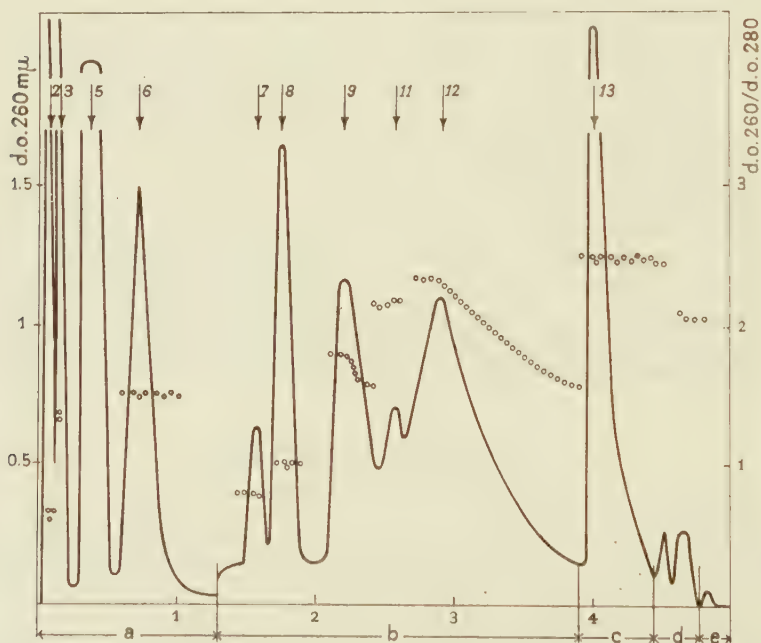


FIGURE 11. - Chromatographie d'un hydrolysate de 200 mg d'ADN du thymus par la DNase de *S. pyogenes* sur une colonne de Dowex I-X₂, 200-240 mesh, 1 × 10 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5 ; fraction a = 0,1 M, fraction b = 0,25 M, fraction c = 0,5 M, fraction d = 1,0 M, fraction e = 2,0 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 85 %. Vitesse d'écoulement : 25 ml/h. 000 : d. o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

Comme nous l'avons déjà dit, le premier critère de pureté d'un « pic » nucléotidique est la constance de son rapport d.o. 260/d.o. 280. On remarque sur cette figure de tels exemples : « pic » n° 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13. Pour les deux « pics » n° 9 et n° 12 on voit au contraire que ce rapport diminue progressivement au cours de l'élution, preuve que deux ou plusieurs substances se trouvent mélangées. Ces deux « pics » sont donc lyophilisés afin de sublimer complètement l'acétate d'ammonium, le matériel obtenu redissous dans 5 ml d'eau distillée (on rend le pH alcalin avec de la soude) et chromatographiés sur une colonne de Dowex I-X₈. Un tel exemple est représenté par la figure 12.

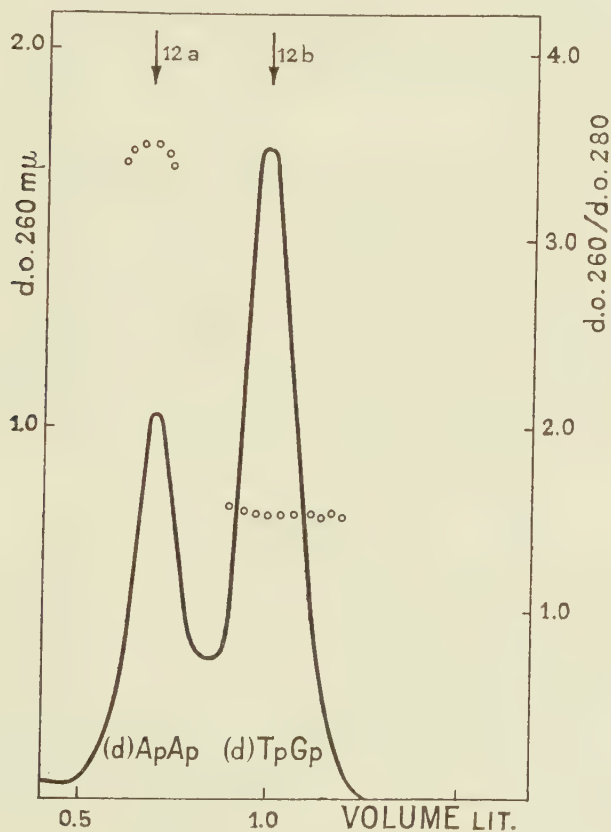
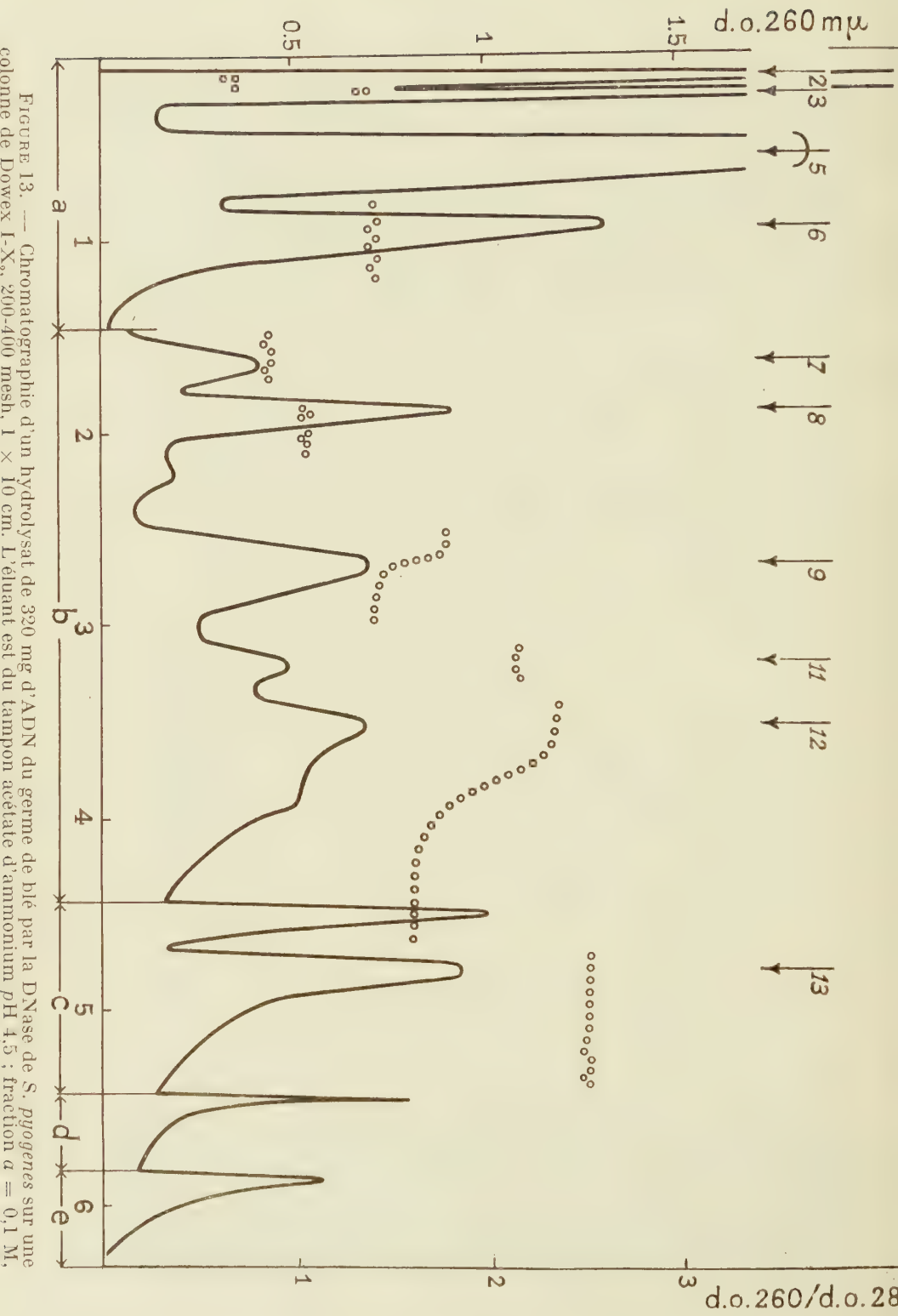


FIGURE 12. — Chromatographie du « pic » n° 12 (fig. 11) sur une colonne de Dowex I-X₈, 200-400 mesh. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5, 1 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 85 %. Vitesse d'écoulement = 30 ml/h. 0000 = d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

On remarque la résolution de ce « pic » n° 12 (fig. 11) en deux « pics » distincts n° 12 a et n° 12 b possédant un rapport d.o. 260/d.o. 280 constant.



La même expérience a été réalisée avec le « pic » n° 9 que nous avons résolu en deux « pics » : n° 9 et n° 10. Tout le matériel obtenu par ces deux chromatographies est alors soumis à une électrophorèse en utilisant comme tampon de l'acétate d'ammonium 0,1 M, pH 3,5 (1 500 volts). Nous avons ainsi vérifié la présence d'une seule tache, autre critère de pureté.

Nous avons alors cherché à connaître la structure de ces oligonucléotides. Pour une meilleure rédaction de ce travail, nous en parlerons dans un paragraphe suivant. Disons seulement que les résultats obtenus nous ont conduit à étudier l'action de la DNase de *S. pyogenes* sur un ADN possédant une autre structure, une autre composition en bases, que celui du thymus : c'est l'ADN du germe de blé. Le processus expérimental décrit ci-dessus a été le même, à cette différence près que 320 mg d'ADN du germe de blé ont été hydrolysés et chromatographiés sur une colonne de Dowex I-X₂ 200-40 mesh, 1 × 15 cm (fig. 13).

On remarque :

a) Que ce diagramme de résolution est semblable, dans ses grandes lignes, à celui obtenu avec l'ADN du thymus (fig. 11) ;

b) Que les « pics » n° 9 et n° 12 sont un mélange de substances nucléotidiques (rapport non constant) ;

c) Comme le montre le tableau XIII, l'ADN du germe de blé n'a pas la même composition en bases que celui du thymus : il possède en outre une base supplémentaire : la méthylcytosine. On pouvait donc s'attendre à voir tous les « pics » nucléotidiques contenant, par exemple, un dinucléotide du type (d) Cp Xp dédoublé en deux : (d) Cp Xp et (d) Mp Xp.

Tableau XIII

Composition en bases des ADN de thymus et de germe de blé.

ADN	A	G	C	M	T	A + T	Auteurs
						G + C + M	
Germe de blé ...	28,1	21,8	16,8	5,9	27,4	1,25	LIPSHITZ et CHARGAFF (1956)
Thymus .	28,7	21,7	20,7	1,7	27,2	1,27	SINSHEIMER et KOERNER (1952)

Or rien de tel n'a été observé. Nous avons donc isolé tous les « pics » et les avons chromatographiés sur une colonne de Dowex I-X₈ (fig. 14, 15, 16, 17, 18, 19). Toutes ces chromatographies montrent la résolution en deux « pics » distincts du « pic » initial obtenu par chromatographie sur une colonne de Dowex I-X₂ (fig. 13).

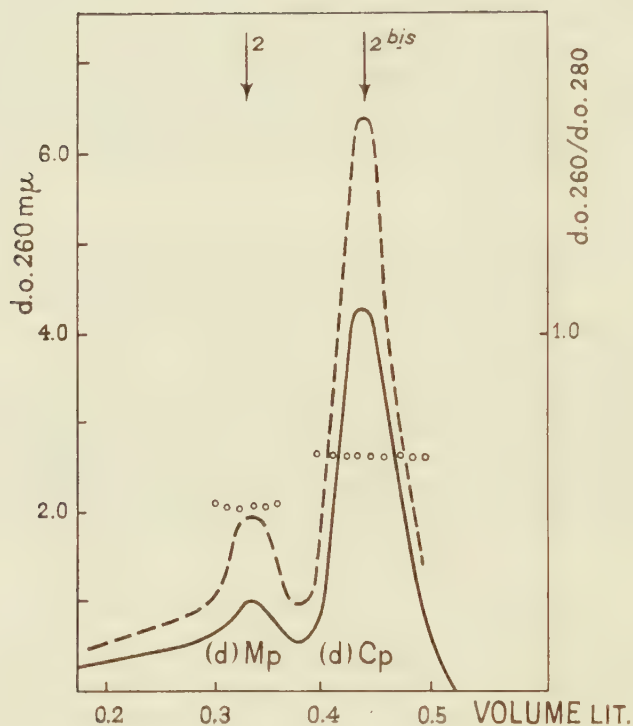


FIGURE 14 : Chromatographie du « pic » n° 2 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I-X₈ 200-400 mesh, 1 × 25 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,3, 0,1 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 83 %. Vitesse d'écoulement = 26 ml/h. En traits discontinus : densité optique à 280 mμ. 000 = d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

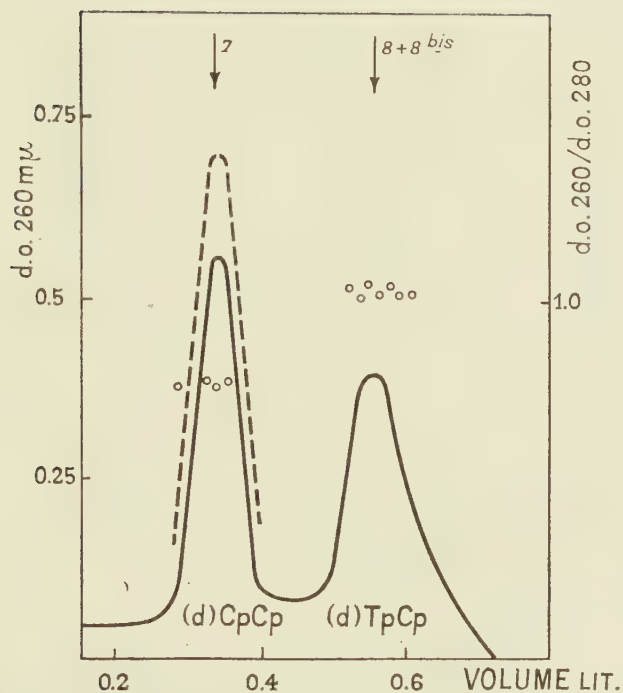


FIGURE 15 : Chromatographie du « pic » n° 7 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I-X₈ 200-400 mesh, 1 × 25 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5 — 0,75 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 80 %. Vitesse d'écoulement = 28 ml/h. En traits discontinus : densité optique à 280 mμ. 000 = d.o 260 mμ/d.o. 280 mμ.

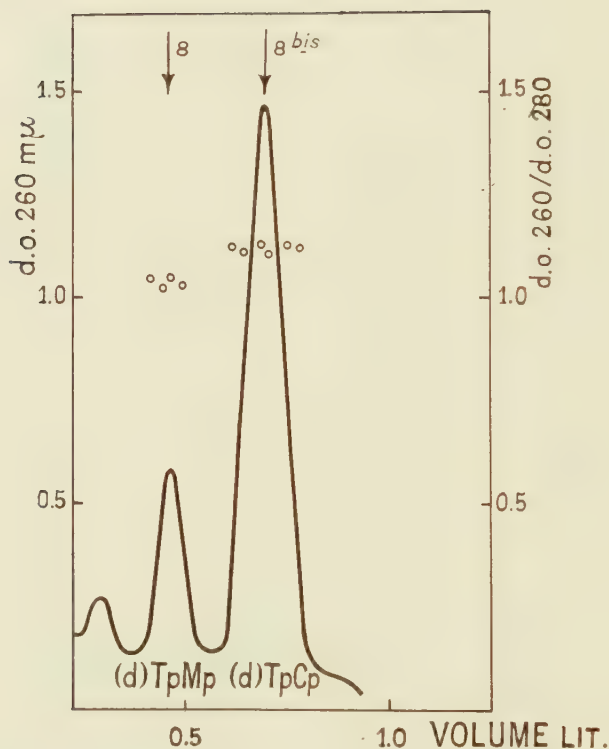


FIGURE 16 : Chromatographie du « pic » n° 8 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I-X₈, 200-400 mesh, 1 × 22 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5 - 0,8 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 82 %. Vitesse d'écoulement = 31 ml/h. 0000 : d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

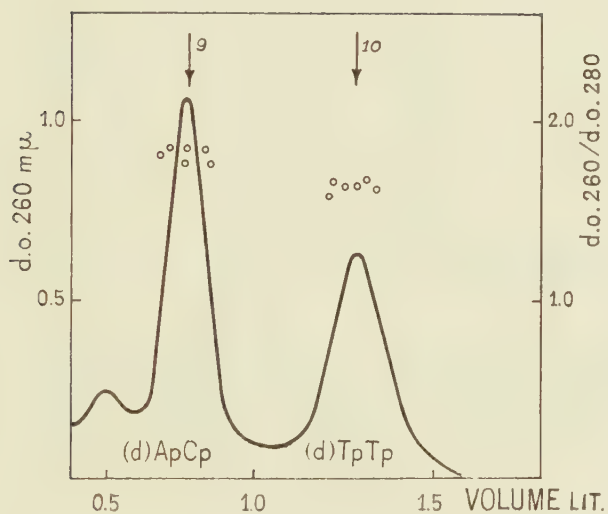


FIGURE 17 : Chromatographie du « pic » n° 9 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I — X₈, 200-400 mesh, 1 × 23 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5 — 0,9 M. % d.o. récupéré = 80 % (à 260 mμ). 0000 = d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

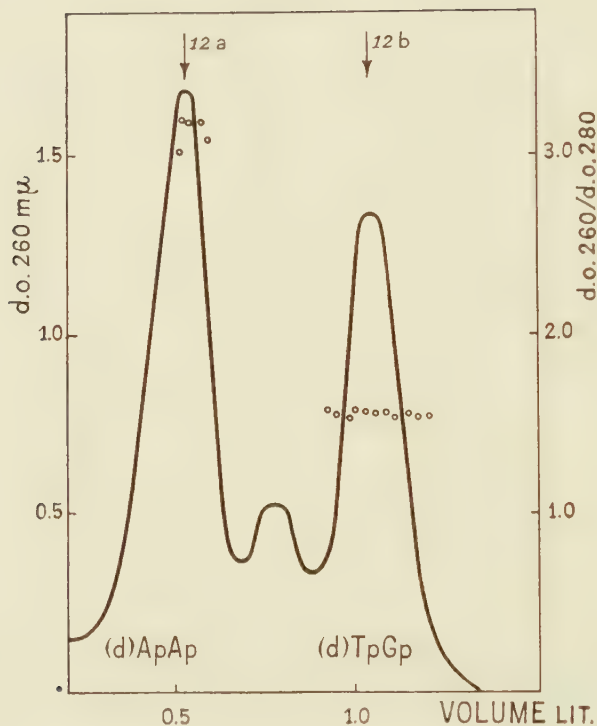


FIGURE 18 : Chromatographie du « pic » n° 12 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I — X₈, 200-400 mesh, 1 × 24 cm. L'éluant est du tampon acétate d'ammonium pH 4,5 — 1,2 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 79 %. Vitesse d'écoulement = 31 ml/h. 0000 = d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

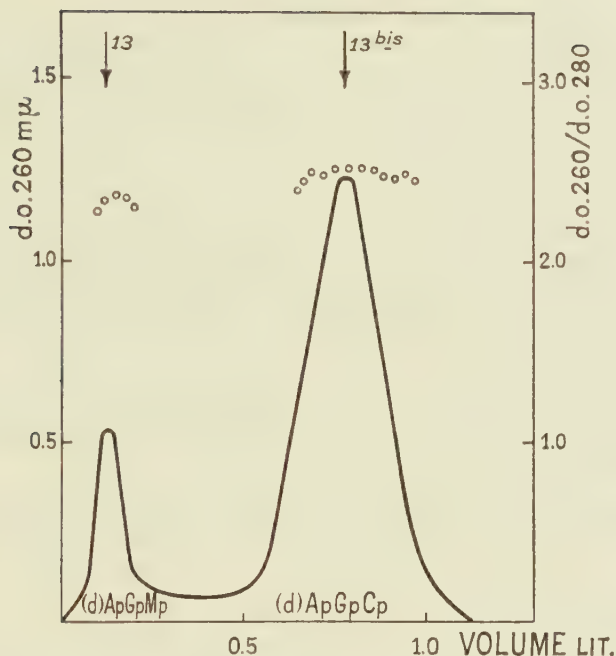


FIGURE 19 : Chromatographie du « pic » n° 13 (fig. 13) sur une colonne de Dowex I — X₈, 200-400 mesh, 1 × 26 cm. L'éluant est du tampon d'acétate d'ammonium pH 4,5 — 1,5 M. % d.o. 260 mμ récupéré = 85 %. Vitesse d'écoulement = 30 ml/h. 000 = d.o. 260 mμ/d.o. 280 mμ.

C) STRUCTURE DES MONONUCLÉOTIDES ET POLYNUCLÉOTIDES

1. MONONUCLÉOTIDES.

a) *Hydrolysat de l'ADN du thymus.*

Nous avons pu identifier dans la fraction 0,1 M (fig. 4) les quatre mononucléotides, à savoir l'acide désoxycytidylique l'acide thymidylique, l'acide désoxyadénylique, l'acide désoxyguanylique. Cette identification a été réalisée en étudiant le spectre de ces différents nucléotides et par électrophorèse (acétate d'ammonium pH 3,5 - 0,1 M, 1 500 volts) selon MARKHAM et SMITH (MARKHAM et SMITH, 1952). Comme l'avait déjà montré CUNNINGHAM (CUNNINGHAM *et al.*, 1956 ; CUNNINGHAM, 1958), ces nucléotides sont terminés par un groupement phosphoryle fixé sur le carbone 3' du pentose.

b) *Hydrolysat de l'ADN du germe de blé.*

Nous avons trouvé des résultats identiques à ceux décrits pour l'ADN du thymus, à cette différence près que l'on trouve un mononucléotide supplémentaire : l'acide désoxyméthyl cytidylique. Nous avons pu vérifier, par le processus suivant, qu'il s'agissait bien de désoxyméthylecytidine 3' monophosphate.

On traite 1 mg de ce composé par la 5'nucléotidase du venin de *Crotalus adamanteus* pendant une heure à 37° (pH 9,0) en présence d'ion Mg^{++} . On n'observe pas de libération de phosphate minéral (FISKE et SUBBAROW, 1925). L'adénosine 5' monophosphate servant de témoin est déphosphorylée quantitativement.

Si l'hydrolysat est soumis à une électrophorèse, le témoin aura une vitesse de migration correspondant à l'adénosine tandis que ce mononucléotide non déphosphorylé aura une vitesse de migration sensiblement égale à celle du nucléotide de référence (d) pM.

Cette expérience a été réalisée avec (d) Cp, (d) Mp, Tp, (d) Ap, (d) Gp.

2. DINUCLÉOTIDES. TRINUCLÉOTIDES.

a) *Identification des bases.*

On traite environ 250 μg de l'oligonucléotide, dont on veut déterminer la composition en bases, par une solution acide concentrée et ceci à haute température. L'acide chlorhydrique à 10 % ou un mélange à volume égal d'acide chlorhydrique 1 N et d'acide formique 10 N ont été utilisés. Mais ce système présente un grave inconvénient : 25 % environ de la cytosine se trouve ont transformés en uracile (WYATT, 1955).

Nous avons donc choisi le processus expérimental suivant (VISCHER *et al.*, 1948) : 250 μg environ de substance nucléotidique sont chauffés pendant 2 heures à 175° dans un tube scellé en présence d'acide formique concentré, que l'on élimine ensuite sous vide. On reprend le résidu par une goutte d'eau.

Les bases ainsi obtenues sont chromatographiées sur papier (WYATT, 1951, ou MARKHAM et SMITH, 1949). Le système de WYATT présente l'avantage d'obtenir une bonne séparation de la cytosine et de la méthylcytosine.

b) *Enchaînement.*

Après avoir identifié les bases des dinucléotides et trinucéotides, nous avons soumis ceux-ci à l'action de la phosphodiesterase du venin de *Crotalus adamanteus* afin de connaître l'ordre d'enchaînement des différents nucléotides.

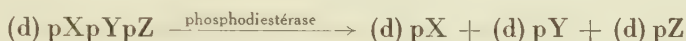
Nous avons vu que la DNase de *S. pyogenes* produisait des mononucléotides terminés par un groupement phosphoryle en 3'. La coupure

se fait donc entre le carbone 5' et le phosphore. Nous écrirons donc un trinuéclotide : (d) XpYpZp. La phosphodiéstérase hydrolyse ce corps suivant la réaction :



On voit que, les bases étant déjà connues, on peut identifier les composés de cette réaction après les avoir séparés par chromatographie sur papier, par un simple dosage de phosphore, ce qui permet de départager nucléosides, nucléosides monophosphates, nucléosides diphosphates. On a alors l'ordre d'enchaînement des nucléotides et la structure du composé hydrolysé.

Si ces oligonucléotides étaient terminés par un groupement phosphoryle en 5', nous aurions



Il serait alors impossible d'établir l'ordre d'enchaînement des nucléotides, chacun de ceux-ci étant un nucléoside monophosphate, par le processus expérimental que nous venons de décrire.

Premier exemple. — Soit le dinucléotide de structure supposée (d) ApCp. Un mg de ce corps est dissous dans 0,2 ml d'eau distillée à laquelle on ajoute 0,2 ml de tampon glycine-NaOH, pH 8,6, 0,2 M, et une unité de phosphodiéstérase (soit environ 20 mg de venin brut de *Crotalus adamanteus*). Cette quantité très importante de phosphodiéstérase, ainsi que la durée très longue de l'hydrolyse (5 jours), sont dues au fait que les oligonucléotides terminés par un groupement phosphoryle en 3', contrairement à ceux dont le groupement phosphoryle est lié au carbone 5' du pentose, sont difficiles à scinder.

L'hydrolysats est alors chromatographié sur papier dans le système isopropanol, solution saturée dans l'eau de sulfate d'ammonium. On élue les différentes taches (fig. 2 et 3,) que l'on identifie par leur spectre et par un dosage de phosphore.



TABLEAU XIV

	μ-moles du nucléoside	P. théorique μg	P. trouvé μg
(d) A	0,600	0	1
(d) pCp	0,630	39	35

La structure supposée (tableau XIV) est ainsi confirmée.

Deuxième exemple. — Soit le trinuécléotide de structure hypothétique (d) ApGpCp.

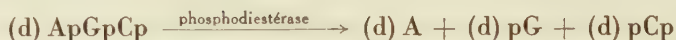


TABLEAU XV

	μ -moles du nucléoside	P. théorique μg	P. trouvé μg
(d) A	0,535	0	0
(d) G(*)	0,336	0	0
(d) pG	0,186	4,7	4
(d) pCp	0,470	20	22

(*) La présence de (d) G s'explique par le fait qu'au fur et à mesure que la phosphodiesterase libère (d) pG, ce composé est déphosphorylé par la 5' nucléotidase. Mais, en fin d'hydrolyse, comme celle-ci dure 5 jours, cet enzyme se trouve inactivé, étant assez instable ; pG n'est plus déphosphorylé.

TABLEAU XVI. — *Variations quantitatives des divers oligonucléotides produits par la DNase de S. pyogenes sur différents ADN.*

N° des fractions	% de la densité optique totale de l'hydrolysât à 260 m μ	
	ADN du thymus	ADN du germe de blé
<i>a</i> = 0,1 M acét. am. mononucléotides	36	45
<i>b</i> = 0,25 M acét. am. dinucléotides	35	30
<i>c</i> = 0,5 M acét. am. trinuécléotides	15	7
<i>d</i> = 1 M + 2 M acét. am. polynucléotides	0,5	1,7
Total (*)	86,5	83,7
% de liaisons rompues (**)	67	75

(*) La perte d'unités spectrophotométriques est due au fait que le rendement de la chromatographie sur une colonne de Dowex I-X₂ n'est pas de 100 % par suite d'une légère adsorption irréversible.

(**) Le nombre de liaisons rompues a été calculé de la façon suivante :

X % de mononucléotides = X % de liaisons rompues.

Y % de dinucléotides = Y/2 % de liaisons rompues.

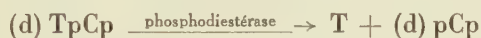
Z % de trinuécléotides = Z/3 % de liaisons rompues.

La fraction *d* a été négligée : les résultats donnés sont donc approximatifs.

On voit que des quantités sensiblement égales de chacune des bases exprimées en μ .moles ont été trouvées pour un même oligonucléotide. Que, d'autre part, une correspondance significative existe entre la quantité du phosphore théorique et celle qui est dosée (tableaux XIV et XV).

La structure de tous les polynucléotides a donc été établie par le processus décrit dans ces deux exemples. Les résultats sont consignés dans les tableaux XVI, XVII, XVIII. Nous n'avons donné dans ces tableaux que les proportions et la structure de l'isomère quantitativement le plus important.

En effet, le dinucléotide (d) TpCp se trouve aussi sous la forme (d) CpTp : il s'agit des deux isomères non séparables par chromatographie sur colonne de Dowex I-X₂ ou Dowex I-X₈. Mais après action de la phosphodiesterase et chromatographie sur papier dans le système isopropanol, solution saturée dans l'eau de sulfate d'ammonium, on remarque la présence de quatre taches identifiées comme suit :



Dans le cas présent nous avons trouvé 80 % de (d) TpCp et 20 % de (d) CpTp.

De même le dinucléotide (d) TpAp se trouve aussi sous la forme (d) ApTp.



Nous avons trouvé 65 % du dinucléotide (d) TpAp et 35 % du dinucléotide (d) ApTp.

Le tableau XVI montre que la DNase de *S. pyogenes* hydrolyse de façon très poussée les ADN soumis à son action. En effet la fraction *d* représente moins de 2 % de la densité optique totale à 260 m μ , tout le reste de l'hydrolysât se trouvant sous forme de mononucléotides, dinucléotides, trinucéotides. C'est une propriété que l'on trouve, à notre connaissance, pour la première fois. On peut aussi remarquer que, suivant l'ADN hydrolysé, les proportions des différentes fractions varient. En effet, en

ce qui concerne l'hydrolysât de l'ADN du germe de blé, la fraction *a* est plus importante (9 %) que pour l'hydrolysât de l'ADN du thymus. Une variation inverse se produit pour la fraction *b* et surtout la fraction *c*. Si l'on considère le nombre de liaisons rompues, on observe que l'ADN du germe de blé subit une hydrolyse plus poussée que l'ADN du thymus. Il semblerait donc que la structure des acides nucléiques modifie le nombre des coupures enzymatiques.

TABLEAU XVII. — Nucléotides produits par l'action de la DNase de *S. pyogenes* sur l'ADN du thymus.

N° des fractions ou « pics » sortant de la colonne de Dowex I	Densité optique totale à 260 mμ d.o. 260 mμ*	% de d.o. 260 totale de l'hydrolysât	Nature des bases	Structure
2	230	5,8	G	(d) Cp
3	390	9,8	T	Tp
5	665	16,6	A	(d) Ap
6	152	3,8	G	(d) Gp
7	44	1,1	C	(d) CpCp
8	197	4,9	C, T	(d) TpCp**
9	75	1,9	A, C	(d) ApCp
10	116	2,9	T	TpTp
11	119	3,0	T, A	(d) TpAp**
12 <i>a</i>	160	4,0	A	(d) ApAp
12 <i>b</i>	320	8,0	T, G	(d) TpGp
13	570	14,3	A, C, G	(d) ApGpCp

(*) La perte d'unités spectrophotométriques est due au fait :

- que les chromatographies sur colonne de Dowex I n'ont pas un rendement de 100 % par suite d'une légère adsorption irréversible ;
- que pour l'isolement et la caractérisation des différents nucléotides, on ne prend que la partie du pic possédant un rapport de d.o. 260/d.o. 280 constant ;
- que nous avons négligé tout « pic nucléotidique » représentant moins de 0,5 % de la densité optique totale à 260 mμ.

(**) On trouve les isomères correspondants à ces deux dinucléotides, soit (d) CpTp et (d) ApTp mais en quantité faible.

TABLEAU XVIII. — Nucléotides produits par l'action de la DNase de *S. pyogenes* sur l'ADN du germe de blé.

N° des fractions ou « pics » sortant de la colonne de Dowex I	Densité optique totale à 260 mμ d.o. 260 mμ*	% de d.o. 260 totale de l'hydrolysate	Nature des bases	Structure
2	82	1,7	M	(d) Mp
2 bis	280	5,75	C	(d) Cp
3	654	11,2	T	Tp
5	940	19,4	A	(d) Ap
6	397	6,8	G	(d) Gp
7	55	0,92	C	(d) CpCp
8	33	0,56	M, T	(d) TpMp
8 bis	240	4,1	C, T	(d) TpCp**
9	141	2,4	A, C	(d) ApCp
10	113	1,83	T	TpTp
11	97	1,47	T, A	(d) TpAp**
12 a	250	4,3	A	(d) ApAp
12 b	280	4,8	A, G	(d) TpCp
13	52	0,9	A, G, M	(d) ApGpMp
13 bis	315	5,4	A, G, C	(d) ApGpCp

(*) La perte d'unités spectrophotométriques est due au fait :

- que les chromatographies sur colonne de Dowex I n'ont pas un rendement de 100 % par suite d'une légère adsorption irréversible ;
- que pour l'isolement et la caractéristique des différents nucléotides, on ne prend que la partie du pic possédant un rapport de d.o. 260/d.o. 280 constant ;
- que nous avons négligé tout pic nucléotidique représentant moins de 0,5 % de la densité optique totale à 260 mμ.

(**) On trouve les isomères correspondant à ces deux dinucléotides, soit (d) CpTp et (d) ApTp, mais en quantité faible.

Nous voudrions faire trois remarques sur les tableaux XVII et XVIII.

a) Qu'il s'agisse d'ADN du thymus ou du germe de blé, bien que la structure de ces deux acides nucléiques soit différente, les résultats obtenus quant à la structure des nucléotides sont les mêmes. Toutefois, on peut remarquer que certains des dinucléotides ou trinucléotides de structure (d) XpCp se trouvent aussi sous la forme (d) XpMp.

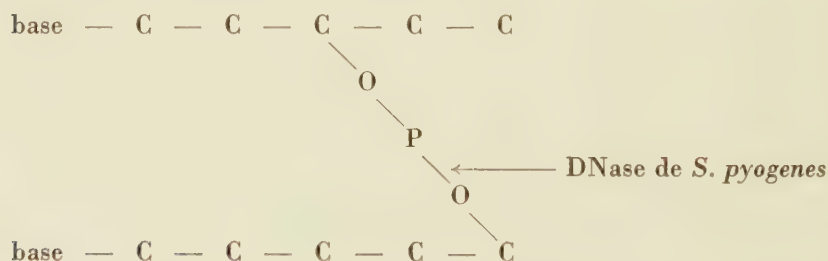
b) Toutes les DNases connues actuellement hydrolysent les acides nucléiques avec production de polynucléotides dont on ne peut définir provisoirement la structure : le nombre de nucléotides qu'ils contiennent est trop élevé. La DNase de *S. pyogenes*, bien au contraire, donne moins de 1 % (en moyenne) de tels composés. On peut donc négliger ceux-ci et dire que le fragment nucléotidique le plus grand est un trinucéotide. Cette propriété nous a permis de définir la structure de tous les nucléotides produits par action d'une nucléase sur un acide nucléique.

c) Nous avons pu, au cours de cette étude, isoler des nucléotides encore inconnus, d'origine naturelle. Citons, à titre d'exemple, comme mononucléotides, la méthylecytidine 3' monophosphate, ainsi que la série des di- et trinucéotides.

DISCUSSION

Nous voudrions attirer l'attention sur les trois points suivants :

a) La désoxyribonucléase de *S. pyogenes* est donc, comme les autres DNases connues actuellement, une endonucléase : elle hydrolyse les liaisons phosphodiester en des points donnés des chaînes polynucléotidiques. Son action n'est donc pas récurrente : elle ne détache pas un nucléotide, puis un autre. Comme le montre la production de mononucléotides, dinucléotides et trinucéotides terminés par un groupement phosphate lié au carbone 3' du désoxyribose, elle coupe la liaison 3'-5' phosphodiester entre le phosphore et le carbone 5' du pentose :



Une autre confirmation de cette spécificité a été apportée par KORNBERG et ses coll. (ADLER *et al.*, 1958). En effet, ces auteurs ont synthétisé de l'acide désoxyribonucléique à partir de (d) pppC, pppT, (d) pppA, (d) pppG, en présence d'un enzyme de *E. coli*. Ces nucléosides triphosphates étaient marqués sur le phosphate lié au désoxyribose. L'ADN ainsi synthétisé est hydrolysé par la DNase de *S. pyogenes* et la phosphomonoestérase de la rate (libération de nucléoside 3' phosphate). Par chromatographie sur colonne de Dowex I, on isole des 3' désoxyribonucléotides marqués.

Si le seul nucléoside triphosphate (d) Cp³²pp est utilisé, on met aussi en évidence de la cytidine et de l'acide 3' désoxycytidylique marqué.

On peut donc dire que, par cette propriété, la DNase de *S. pyogenes* s'apparente avec celle du thymus qui, elle aussi, hydrolyse les ADN avec production de nucléosides 3' phosphates. Mais ici s'arrête cette analogie car les autres résultats obtenus avec la DNase de *S. pyogenes* sont entièrement différents de ceux décrits pour la DNase II.

b) Avec l'ADN du thymus utilisé comme substrat, il est difficile de définir une spécificité stricte (tableau XVII). Ces résultats nous ont conduit à étudier les oligonucléotides produits par cette DNase sur un ADN de structure différente : celui du germe de blé. Les résultats obtenus montrent des variations quantitatives, mais non qualitatives. En effet, si l'on assimile la cytosine à la méthylecytosine, on remarque que les dinucléotides et les trinucléotides ont la même structure, et qu'ils se trouvent en nombre identique.

c) Une production aussi élevée de chacun des mononucléotides (de 5 à 20 %) semble interdire d'avance toute définition d'une spécificité stricte. Mais si l'on examine la série des dinucléotides et trinucléotides, on remarque que l'on trouve cinq dinucléotides du type (d) TpXp, à savoir (d) TpCp, (d) TpMp, TpTp, (d) TpAp, (d) TpGp. D'autre part, ces dinucléotides se trouvent en quantité plus importante que les autres. Il semble possible de conclure que la liaison TpXp, X représentant une base purique ou pyrimidique, est plus difficilement rompue que les autres liaisons ou que, pour respecter la nomenclature la plus admise, la liaison XpTp est préférentiellement hydrolysée.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le présent travail a essentiellement consisté en l'étude de la spécificité de la désoxyribonucléase (DNase) de *Staphylococcus pyogenes*, c'est-à-dire de la place où se fait la rupture des liaisons internucléotidiques au moment de la dépolymérisation des acides désoxyribonucléiques (ADN). Pour ce faire, nous avons cherché à connaître la structure de tous les oligonucléotides produits par l'action de cette DNase sur différents ADN. Quand nous avons commencé à travailler sur ce problème, de nombreux auteurs avaient déjà défini la spécificité de DNases d'origine variée. C'est pour cette raison qu'il nous a semblé intéressant d'apporter un instrument de travail supplémentaire pour connaître la structure des ADN. Mais avant d'entreprendre cette étude, il nous a fallu purifier cet enzyme.

I. PURIFICATION DE LA DNase DE *S. PYOGENES*

1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et dialyse.

Le milieu de culture qui contient la DNase sécrétée par *S. pyogenes*, est centrifugé afin d'éliminer le culot bactérien, puis soumis à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. Ceci permet de ne garder pour le reste de la purification que des protéines de poids moléculaire moyen. Le précipité une fois redissous est dialysé contre un grand volume d'eau distillée, et le dialysat est lyophilisé. On obtient ainsi, si l'on part de 6 litres de milieu de culture, 7 g d'une poudre brune contenant 11 000 U. viscosimétriques par mg.

2. Chromatographie.

Cette substance est alors chromatographiée sur une résine échangeuse de cations, l'Amberlite IRC 50 XE-64, à un pH tel que le minimum d'impuretés et la DNase se trouvent adsorbés. La plus grande partie du matériel absorbant à 280 m μ sort de la colonne sans subir aucune rétention. Lorsque la densité optique est tombée à une valeur très faible et constante, on crée un gradient de force ionique et de pH. On observe alors la sortie d'un pic protéique contenant toute l'activité en DNase. Ce « pic » s'est révélé être homogène. L'éluat renfermant la DNase est alors dialysé afin d'éliminer le tampon et lyophilisé. Nous avons trouvé que la substance ainsi obtenue contenait 80 U. spectrophotométrique par mg. Notons, à titre de comparaison, que la DNase pancréatique donne par le même dosage 10 U. spectrophotométrique par mg. Nous avons ainsi réussi à multiplier l'activité spécifique par 4 500 fois environ.

Quelques auteurs avaient mis en évidence que cette DNase avait aussi une action ribonucléasique, ceci dans le rapport de 4 à 1. Nous avons dosé cette activité dans la fraction obtenue après chromatographie : nous avons trouvé un rapport de 400 à 1. D'autre part, au cours des différents stades

de la purification, nous avons aussi recherché la présence de l'activité en RNase et avons remarqué que cette activité diminuait au fur et à mesure que l'activité spécifique en DNase augmentait, autrement dit que le rapport DNase/RNase n'était pas constant. La DNase de *S. pyogenes* ne possède donc pas d'activité en RNase, celle-ci étant due à un enzyme distinct que nous éliminons presque complètement au cours de la purification.

II. PROPRIÉTÉS DE CET ENZYME EN TANT QUE PROTÉINE

La DNase de *S. pyogenes* a son pH optimum d'activité à 8,6 en présence d'ions Ca^{++} à la concentration de $3,3 \cdot 10^{-3}$ M. Une concentration supérieure ou inférieure se traduit par une chute de l'activité. Cette propriété explique pourquoi les agents complexant les métaux, tels que le citrate de sodium ou le versène, font disparaître la majeure partie de l'activité. Les autres cations divalents comme le Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Ba^{++} , ont une action inhibitrice très nette. Il en est de même des agents réducteurs comme la cystéine, le thioglycolate, le glutathion.

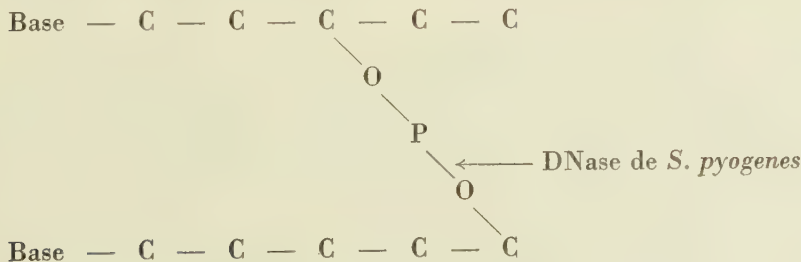
III. SPÉCIFICITÉ DE LA DNase DE *S. PYOGENES*

Comme le montre la production d'oligonucléotides de poids moléculaire varié, cet enzyme possède une propriété commune avec les autres DNases : c'est une endonucléase.

1. Mononucléotides.

Par chromatographie sur une colonne de Dowex I, nous avons pu isoler à l'état pur quatre mononucléotides s'il s'agit d'un hydrolysat d'ADN du thymus, et cinq dans le cas de l'ADN du germe de blé : l'acide désoxyméthylecytidylique, l'acide désoxycytidylique, l'acide thymidylique, l'acide désoxyadénylique, l'acide désoxyguanylique.

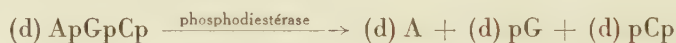
La 5'-nucléotidase dont l'action consiste à détacher le groupement phosphate d'un nucléoside monophosphate quand ce groupement est fixé sur le carbone 5' du pentose, n'a pas d'action sur ces nucléotides. On peut donc en conclure, et l'étude de la structure des polynucléotides le montrera aussi, que ce groupement phosphate est fixé sur le carbone 3' du désoxy-ribose. Il s'agit donc d'un nucléoside 3'-monophosphate et la dépolymérisation des ADN se fait par coupure entre le groupement phosphate et le carbone 5' du pentose.



2. Dinucléotides. Trinucléotides.

La première chromatographie sur colonne de Dowex I-X₂, ne permet pas d'isoler à l'état pur tous les dinucléotides et trinucléotides. Certains « pics » nucléotidiques renferment en effet au moins deux composés. Une seconde chromatographie sur une colonne de Dowex I-X₈, dont le pouvoir de résolution est plus élevé, est nécessaire : l'acide désoxythymidylcytidylique et l'acide désoxythymidyl-méthylcytidylique par exemple, se trouvent ainsi séparés. Après isolement à l'état pur de tous les oligonucléotides, nous avons recherché leur composition en bases et les avons soumis à l'action de la phosphodiesterase du venin de *Crotalus adamanteus* afin de définir leur structure.

Soit, par exemple, le trinucléotide de structure supposée : (d) ApGpCp. La phosphodiesterase, hydrolysant les liaisons internucléotidiques entre le groupement phosphoryle et le groupement 3' du pentose, nous aurons comme le montre la réaction suivante, libération de désoxyadénosine, désoxyguanosine-5'-monophosphate, désoxycytidine-3'-5'-diphosphate :



Par chromatographie sur papier on sépare ces différents composés que l'on peut alors identifier (spectre, électrophorèse, dosage de phosphore). La structure de tous les polynucléotides a pu être ainsi définie.

La DNase de *S. pyogenes* produit 35 % de mononucléotides et 50 % de di- et trinucléotides si le substrat utilisé est l'ADN du thymus : 45 % et 37 % de ces mêmes composés si l'ADN est celui du germe de blé. Les polynucléotides de poids moléculaire plus élevé représentent moins de 1 % en moyenne de la densité optique totale de l'hydrolysate à 260 mμ et sont donc négligeables.

Ces propriétés très particulières permettent de dire :

— que vu la simplicité de ces oligonucléotides, nous avons pu, et ceci pour la première fois à notre connaissance, identifier tous les nucléotides produits par action d'une nucléase sur un acide nucléique. En effet, les autres DNases et RNases connues actuellement donnent une quantité importante de polynucléotides dont la complexité interdit provisoirement toute étude de structure ;

— que le fragment nucléotidique le plus grand est un trinucléotide ;

— que la structure des acides nucléiques semble modifier le nombre de coupures enzymatiques.

A titre d'exemple, voici quelques-uns de ces oligonucléotides : (d) TpCp, TpTp, (d) TpAp, (d) ApAp, (d) TpGp, (d) ApGpCp, etc...

Au cours de ces études de structure, nous avons pu isoler certains nucléotides d'origine naturelle non encore connus. Citons, à titre d'exemple, comme mononucléotide, la méthylcytidine-3'-monophosphate, et la série des di- et trinucléotides,

Une production aussi élevée de chacun de ces mononucléotides (de 5 à 20 %) semble interdire d'avance toute définition d'une spécificité

stricte. Mais si l'on examine la série des dinucléotides, on remarque que l'on trouve cinq dinucléotides du type (d) TpXp, à savoir (d) TpCp, (d) TpMp, TpTp, (d) TpAp, (d) TpGp. D'autre part, ces nucléotides se trouvent en quantité plus importante que les autres. On peut donc conclure que la liaison XpTp est préférentiellement hydrolysée.

Spécificité

Substrat	= DNA
Type d'attaque	= endonucléase
Produits	= terminés par des groupements 3' phosphates
Liaison préférentiellement rompue	= XpTp

Quels enseignements peut-on tirer de cette étude quant à la structure des ADN ? Comme l'ont montré de nombreux auteurs, le fait que l'on obtienne à partir d'un même substrat des oligonucléotides tantôt terminés par des groupements 5' phosphates, tantôt par des groupements 3' phosphates comme c'est le cas pour la DNase de *S. pyogenes*, est une confirmation irréfutable de la liaison 3'-5' phosphodiester.

SINSHEIRNER a pu isoler après action de la DNase pancréatique des nucléotides tels que (d) pC pC pC, (d) pC pC pT, (d) pT pT pT, d'autre part nous avons pu caractériser aussi dans des hydrolysats d'ADN du thymus par la DNase de *S. pyogenes*, des oligonucléotides tels que : (d) Ap Ap, (d) Ap Gp Cp... L'existence de ces oligonucléotides tend à montrer que les ADN seraient comme les ARN, constitués de chaînes où alterneraient des groupes de trois ou quatre nucléotides pyrimidiques avec trois ou quatre nucléotides puriques. Un tel schéma est parfaitement compatible avec la théorie de WATSON et CRICK, par contre il porte un coup fatal, si besoin était, à la théorie des tétranucléotides.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER J., LEHMAN I.R., BESSMAN J., SIMMS E.S. et KORNBERG A. (1958). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 641.
- BEAVEN G.H., HOLIDAY E.R. et JOHNSON E.A. (1955). — Vol. I, p. 473, dans the *Nucleic Acids*, éd. par Chargaff E. et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- COHN W.E. (1950). — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2811.
- COHN W.E. (1955). — Dans the *Nucleic Acids*, vol. I, p. 211, éd. par Chargaff et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- COHN W.E. (1957). — Dans *Methods in Enzymology*, vol. III, p. 724, éd. par Colowick J.P. et Kaplan N.O., New York Acad. Press Inc.
- CUNNINGHAM L. (1958). — *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2546.
- CUNNINGHAM L. (1959). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **81** (3), 788.
- CUNNINGHAM L. et LASKOWSKI M. (1953). — *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 590.
- CUNNINGHAM L., WESLEY E., CATLIN B. et PRIVAT DE GARILHE M. (1956). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4642.
- DAVIDSON J.N. (1949). — *Ann. Rev. Biochem.*, **18**, 155.
- DAVIDSON J.N. (1953). — *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Londres, Methuen et C^o Ltd.
- EULER H.V. et HAHN L. (1946). — *Swensk. Kem. Tidskr.*, **58**, 251.
— (1947). — *Chem. Abstr.*, **41**, 2108.
- FISKE C.H. et SUBBAROW Y. (1925). — *J. Biol. Chem.*, **66**, 375.
- FREDERIQ E. et OTH A. (1958). — *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 281.
- HAESSLER H.A. et CUNNINGHAM L. (1957). — *Exp. Cell Research*, **13**, 304.
- HEPPEL L.A. et RABINOWITZ J.C. (1958). — *Ann. Rev. Biochem.*, **27**, 613.
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. (1953). — *J. Biol. Chem.*, **200**, 493.
- KALINSKY G., HUMMEL J.P., RESNICK H., CARTER J.R., BARNETT L.B. et DIERKS (1959). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **81** (3), 542.
- KAY E.R.M., SIMMONS N.S. et DOUNCE A.L. (1952). — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1724.
- KUNITZ M. (1946). — *J. Biol. Chem.*, **164**, 567.
- KUNITZ M. (1950). — *J. Gen. Physiol.*, **33**, 349.
- LASKOWSKI M. (1959). — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **81** (3), 776.
- LASKOWSKI M. et SEIDEL M.K. (1945). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **7**, 465.
- LASKOWSKI M., STERBERL E.A., AKKA R. et WATSON P. (1954). — *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 595.
- LAURILA U.R. et LASKOWSKI M. (1957). — *J. Biol. Chem.*, **228**, 49.
- LIPSHITZ R. et CHARGAFF E. (1956). — *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 256.

- LEHMAN I.R., BESSMAN M.J., SIMMS E.S. et KORNBERG A. (1958). — *J. Biol. Chem.*, **233**, 163.
- Mc CARTY M. (1949). — *J. Exp. Med.*, **90**, 543.
- Mc DONALD M. (1955). — Dans *Methode in Enzymology*, vol. III, p. 427, éd. par Colowick S.P. et Kaplan N.O., New York Acad. Press Inc.
- MARKHAM R. et SMITH J.D. (1949). — *Biochem. J.*, **45**, 294.
- MARKHAM R. et SMITH J.D. (1952). — *Biochem. J.*, **52**, 552.
- MARKHAM R. et SMITH J.D. (1955). — Dans *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 256, éd. par Chargaff E. et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- MAVER M.E. et GRECO A.E. (1949). — *J. Biol. Chem.*, **181**, 861.
- NORTHROP J.H., KUNITZ M. et HERRIOT R.H. (1948). — *Crystalline Enzymes*, Columbia Univers. Press, New York.
- POTTER J.L., LAURILA U.R. et LASKOWSKI M. (1958). — *J. Biol. Chem.*, **233**, 915.
- POTTER J.L. et LASKOWSKI M. (1959). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 1263.
- PRIVAT DE GARILHE M. et LASKOWSKI M. (1955). — *J. Biol. Chem.*, **223**, 661.
— (1955). — *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 370.
- PRIVAT DE GARILHE M., FASSINA G., POCHON F. et PILLET J. (1958). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1905.
- RAZZEL W.E. et KHORANA H.G. (1958). — *J. Am. Chem. Soc.*, **221**, 1770.
- REDDI K.K. (1959). — *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 132.
- SALMON J. (1952). — *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **146**, 792.
- SCHMIDT G. (1955). — Dans *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 555, éd. par Chargaff E. et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- SHIMOMURA M. et LASKOWSKI M. (1957). — *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 198.
- SINSHEIMER R.L. (1954). — *J. Biol. Chem.*, **208**, 445.
- SINSHEIMER R.L. (1954). — *J. Biol. Chem.*, **215**, 579.
- SINSHEIMER R.L. et KOERNER J.F. (1951). — *Science*, **114**, 42.
— (1952). — *J. Biol. Chem.*, **198**, 293.
- SMITH J.D. (1955). — Dans *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 267, éd. par Chargaff E. et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- SMITH J.D. et MARKHAM R. (1952). — *Nature*, **170**, 120.
- VISCHER E. et CHARGAFF E. (1947). — *J. Biol. Chem.*, **168**, 781.
- VISCHER E. et CHARGAFF E. (1948). — *J. Biol. Chem.*, **176**, 715.
- VOLKIN E., KHYM J.X. et COHN W.E. (1951). — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1533.
- VOLKIN E. et COHN W.E. (1953). — *J. Biol. Chem.*, **205**, 767.
- WEBB M. (1952). — *Nature*, **169**, 417.
- WEBB M. (1953 a). — *Exp. Cell Research*, **5**, 16.
- WEBB M. (1953 b). — *Exp. Cell. Research*, **5**, 27.
- WECKMAN B.G. et CATLIN B.W. (1957). — *J. Bact.*, **73**, 747.
- WROBLEWSKI F. et BODANSKY O. (1949). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 443.
- WYATT G.R. (1951). — *Biochem. J.*, **48**, 584.
- WYATT G.R. (1955). — Dans *The Nucleic Acids*, vol. I, p. 258, éd. par Chargaff E. et Davidson J.N., New York Acad. Press Inc.
- YOSHIDA S. (1941). — *J. Biochem. (Japon)*, **34**, 23.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
GÉNÉRALITÉS ET MÉTHODES D'ÉTUDES DANS LE DOMAINE DES ACIDES NUCLÉIQUES	
Chapitre premier. — NOMENCLATURE.....	8
Chapitre II. — GÉNÉRALITÉS SUR LES ENZYMES HYDROLYSANT LES ACIDES NUCLÉIQUES ET SPÉCIALEMENT LES DÉSOXYRIBONUCLÉASES...	10
A) <i>Désoxyribonucléases</i>	11
1. Désoxyribonucléase pancréatique ou DNase I	11
2. Désoxyribonucléase du thymus ou DNase II	12
3. Désoxyribonucléase de streptocoque ou streptodornase ...	13
B) <i>Phosphodiesterase du venin de Crotalidés</i> (Crotalus adamanteus).	14
C) <i>Phosphatases</i> = 5' nucléotidase.....	14
Chapitre III. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	16
A) <i>Préparation des acides désoxyribonucléiques</i>	16
I. — Préparation de désoxyribonucléate de sodium du thymus de veau	16
II. — Préparation de désoxyribonucléate de sodium du germe de blé.....	18
B) <i>Description de quelques méthodes d'investigation dans le domaine des acides nucléiques</i>	19
I. — Spectrophotométrie.....	19
II. — Electrophorèse	20
III. — Chromatographie sur papier.....	21
1. Séparation des bases puriques et pyrimidiques et des nucléosides correspondants.....	21
2. Séparation des nucléotides.....	21
IV. — Chromatographie sur échangeur d'anions.....	23
V. — Chromatographie d'un hydrolysât d'ADN.....	23
C) <i>Méthode de culture de S. pyogenes en fonction de la production de DNase</i>	24
D) <i>Description de quelques méthodes de dosage des enzymes nucléo- lytiques</i>	27
I. — Désoxyribonucléases	27
1. Méthode spectrophotométrique de KUNITZ.....	27
2. Méthode viscosimétrique de LASKOWSKI et SEIDEL.	29

II. — Ribonucléases	30
1. Méthode spectrophotométrique de KUNITZ.....	30
2. Méthode dite du « phosphore soluble ».....	31
III. — Phosphodiesterase	32
IV. — 5' nucléotidase	32

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS EN TANT QUE PROTÉINE DE LA DNase DE *S. PYOGENES*

Chapitre premier. — PURIFICATION DE LA DNase DE <i>S. pyogenes</i>	33
I. — Premières étapes de la purification.....	33
1. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium...	33
2. Dialyse	35
II. — Chromatographie sur Amberlite IRC 50.....	35
III. — Dosages d'autres activités nucléasiques sur la fraction obtenue après chromatographie.....	37
1. Activité en RNase.....	37
2. Activité en phosphodiesterase	38
Chapitre II. — INHIBITION ET ACTIVATION DE LA DNase DE <i>S. pyogenes</i> PAR DIFFÉRENTS AGENTS CHIMIQUES.....	39
1. Inhibition par les agents réducteurs	40
2. Inhibition par les agents de chélation	40
3. Activation par les sels de calcium	41
4. Inhibition par d'autres cations divalents	41

DÉSOXYRIBONUCLÉOTIDES PRODUITS PAR ACTION DE LA DNase DE *S. PYOGENES* SUR DIFFÉRENTS ADN

A) <i>Hydrolyse des ADN</i>	43
B) <i>Chromatographie sur des colonnes de Dowex</i>	44
C) <i>Structure des mononucléotides et polynucléotides</i>	53
1. Mononucléotides	53
2. Dinucléotides. Trinucléotides.....	54
a) Identification des bases.....	54
b) Enchaînement	54
c) Discussion	60
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.....	62

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**“ THÉORIES BIOCHIMIQUES
EN RELATION AVEC LE DIABÈTE ALLOXANIQUE ”.**

Vu et approuvé :

Paris, le 24 Mai 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

Jean SARRAILH

